

MARIELE CRISTINA NASCIMENTO AGARUSSI

**EFEITO DE EMURCSECIMENTO E DE INOCULANTE BACTERIANO SOBRE A  
POPULAÇÃO MICROBIANA E PERFIL FERMENTATIVO EM SILAGEM DE  
ALFAFA EM CONDIÇÕES TROPICAIS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

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

T

A261e  
2015

Agarussi, Mariele Cristina Nascimento, 1990-  
Efeito de emurchecimento e de inoculante bacteriano sobre a população microbiana e perfil fermentativo em silagem de alfafa em condições tropicais / Mariele Cristina Nascimento Agarussi. – Viçosa, MG, 2015.  
xiii, 56f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Odilon Gomes Pereira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.50-56.

1. Bactérias do ácido lático. 2. Silagem.  
3. DigestibilidadeAlfafa. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 579.35

**MARIELE CRISTINA NASCIMENTO AGARUSSI**

**Efeito de emurchecimento e de inoculante bacteriano sobre a população microbiana e perfil fermentativo em silagem de alfafa em condições tropicais**

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

APROVADA: 24 de fevereiro de 2015.

---

Prof.<sup>a</sup> Karina Guimarães Ribeiro  
(Coorientadora)

---

Prof.<sup>a</sup> Stefanie Alvarenga Santos

---

Prof. Odilon Gomes Pereira  
(Orientador)

AOS MEUS PAIS

ANA E TADEU

DEDICO!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado pelo caminho correto, fazendo-me acreditar que eu seria capaz e me ajudando a superar as dificuldades.

Aos meus pais Ana e Tadeu, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade e mesmo suportando minha ausência, confiaram no meu potencial e apoiaram nas minhas decisões com carinho e compreensão.

Aos meus avós por se orgulharem de mim e sempre torcerem pelo meu futuro com a famosa frase “Vai em frente minha neta”

Aos meus tios e primos que estiveram sempre dispostos a me ajudar com palavras de incentivos e bons pensamentos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

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

Ao professor Odilon Gomes Pereira por ter confiado em meu potencial e ter me dado grandes oportunidades.

As professoras Karina Guimarães Ribeiro e Stefanie Alvarenga Santos pelas colaborações.

Aos meus companheiros científicos do laboratório de Forragicultura da UFV - Leidy, Vanessa, Aline, Augusto, Leandro, Néia e Juliana por terem compartilhado experiências, risadas e desesperos.

Aos meus anjos da guarda Thiago (Timão) e Eliana que com toda paciência e carinho iluminaram meu caminho nos momentos de dificuldades.

A todos meus amigos que torceram por mim, especialmente Cássia, Bruninho e minhas companheiras de república Taís e Ju, por sempre estarem presentes compartilhando dos momentos bons e ruins.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

## BIOGRAFIA

Mariele Cristina Nascimento Agarussi, filha de Ana Maria do Nascimento Agarussi e Alvaro Tadeu Agarussi, nasceu em 09 de maio de 1990, em Itu – SP.

Em março de 2008 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, concluindo em maio de 2013. Em agosto de 2013 ingressou no mestrado em Zootecnia, no curso de Pós-Graduação em Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa-MG.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	3
2.1 Local do experimento e condições climáticas .....	3
2.2 Delineamento experimental. ....	3
2.3 Plantio, colheita e ensilagem da alfafa.....	3
2.4 Composição química.....	4
2.5 Perfil fermentativo .....	4
2.6 Quantificação das populações microbianas .....	5
2.7 Isolamento de bactérias láticas .....	5
2.8 Caracterização de bactérias láticas.....	6
2.9 Identificação das bactérias láticas.....	7
2.10 Filogenia molecular.....	8
2.11 BOX-PCR.....	8
2.12 Análises estatísticas.....	8
3. RESULTADOS .....	10
3.1 Composição química e populações microbianas da alfafa antes da ensilagem .....	10
3.2 Populações microbianas e perfil fermentativo .....	10
3.3 Composição química após 56 dias de fermentação .....	14
3.4 Identificação das bactérias láticas.....	15
3.5 Análise filogenética. ....	21
3.6 Sucessão das bactérias láticas .....	22
3.7 BOX PCR .....	25
3.8 Caracterização dos isolados .....	29
4 DISCUSSÃO.....	42

4.1	Composição química e populações microbianas antes da ensilagem .....	42
4.2	Populações microbianas e perfil fermentativo .....	43
4.3	Composição química após 56 dias de fermentação .....	45
4.4	Identificação, sucessão de bactérias lácticas e filogenia. ....	46
5	CONCLUSÃO .....	49
6	REFERÊNCIAS .....	50



## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1 Caracterização da composição química, do pH e da população microbiana da alfafa antes da ensilagem.
- Tabela 2 P-valor e erro padrão da média das variáveis do perfil fermentativo de silagens de alfafa submetidas ou não ao emurchecimento e a inoculação microbiana em diferentes dias de fermentação.
- Tabela 3 Populações microbianas e variáveis do perfil fermentativo de silagens de alfafa submetidas ou não ao emurchecimento e a inoculação microbiana em diferentes dias de fermentação.
- Figura 1 Contagem da população de enterobactérias (A) e leveduras (B) em silagens de alfafa em função do período de fermentação.
- Figura 2 Comportamento do pH (A) e da concentração de N-NH<sub>3</sub> (B) das silagens em função do período de fermentação.
- Figura 3 Concentração de ácido acético (A), ácido propiônico (B) e ácido lático (C) de silagens de alfafa em função do período de fermentação.
- Tabela 4 Composição química das silagens de alfafa aos 56 dias de fermentação
- Tabela 5 Identificação das sequências do produto PCR do 16S rDNA dos isolados.
- Figura 4 Árvore filogenética de sequências parciais do 16S rDNA de estirpes isoladas e sequencias de bactérias identificadas pertencentes ao banco de dados de nucleotídeos do Genbank. *Bacillus subtilis* (X60646.1) foi utilizado como grupo externo. A árvore foi reconstruída pelo método “Neighbor-joining”, e os números nos nós das ramificações da árvore referem aos valores de bootstrap (expresso como porcentagem de 1000 réplicas).
- Figura 5 Sucessão de bactérias lácticas na planta (dia 0) e em silagem de alfafa não emurchecida nos diferentes períodos de fermentação.
- Figura 6 Sucessão de bactérias lácticas na planta (dia 0) e em silagem de alfafa emurchecida nos diferentes períodos de fermentação.

- Figura 7 Análise da diversidade genética de *Lactobacillus plantarum* da silagem de alfafa pelo fingerprint BOX-PCR. Gel de agarose (1,6 %) mostrando os produtos de PCR do BOX-PCR. Os elementos genômicos BOX foram amplificados usando o primer BOX A1R. As linhas estão identificadas com os isolados e nas extremidades o marcador (DNA ladder 1kb).
- Figura 8 Dendograma de similaridade genética. O perfil BOX-PCR dos *Lactobacillus plantarum* foi comparado com o software BioNumerics 5.10
- Tabela 6 Caracterização dos isolados de bactérias lácticas isoladas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.
- Tabela 7 Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BAL, bactéria ácido láctica
- ENT, Enterobactérias
- FDN, Fibra insolúvel e detergente neutro
- MS, Matéria seca
- $\text{NH}_3/\text{NT MS}$ , Nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total na matéria seca
- NIDA, Nitrogênio insolúvel em detergente ácido
- CHOsol, Carboidratos solúveis
- HEM, Hemicelulose
- PB, Proteína bruta
- UFC, Unidades formadoras de colônias
- EPM, Erro padrão da média

## RESUMO

AGARUSSI, Mariele Cristina Nascimento, M.Sc., Universidade federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Efeito de emurchecimento e de inoculante bacteriano sobre a população microbiana e perfil fermentativo em silagem de alfafa em condições tropicais.** Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientadora: Karina Guimarães Ribeiro.

Avaliou-se o perfil fermentativo, a composição química e as populações microbianas de silagens de alfafa emurchecida ou não, tratadas com inoculante bacteriano em diferentes períodos de fermentação; bem como o isolamento, a identificação e a caracterização das bactérias do ácido láctico (BAL) das silagens não inoculadas. Foi utilizado um esquema fatorial  $2 \times 2 \times 6$ , ausência ou presença de emurchecimento (E), com e sem inoculante bacteriano (I) e seis períodos de fermentação (P) (1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias), no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. A alfafa foi colhida aos 50 dias de rebrotação e picada em partículas de 1,5 cm. A alfafa foi emurchecida por 6h, no campo, no material submetido a esse tratamento. O inoculante usado foi o Sil-All® 4x4 W.S. (Alltech, Brasil), aplicado na taxa de  $10^5$  UFC/g (5 g/t de forragem). Após a aplicação dos tratamentos, a forragem foi ensilada em sacos plásticos de 25 × 35 cm e selados a vácuo. O emurchecimento da alfafa reduziu a capacidade tampão e as concentrações de carboidratos solúveis em água e aumentou o teor de MS da forragem de 133,9 g/kg MS para 233,4 g/kg MS, antes da ensilagem. Foi observado efeito ( $P < 0,05$ ) de E sobre os teores de MS, PB, NIDA e FDN das silagens aos 56 dias de fermentação. As populações de BAL e fungos não foram afetadas por nenhum dos fatores estudados, enquanto as populações de enterobactérias e leveduras foram afetadas ( $P < 0,05$ ) pelo P. O pH e a concentração de nitrogênio amoniacal foram afetados ( $P < 0,05$ ) pela interação E × P, registrando-se menores valores destas variáveis nas silagens emurchecidas. Também foi observado efeito ( $P < 0,05$ ) da interação E × P sobre o conteúdo dos ácidos láctico, acético e propiônico, sendo registrados menores valores de ácido acético nas silagens emurchecidas em todos os períodos de fermentação. Menores concentrações de ácido propiônico também foram encontradas nas silagens emurchecidas. Excetuando o 1º dia de fermentação, foram observadas maiores concentrações de ácido láctico nas silagens emurchecidas, no entanto, a partir do 7º dia, a concentração deste ácido decresceu em ambas as silagens emurchecidas ou não. A adição de inoculante bacteriano na presença ou não do emurchecimento, não promove melhorias no

processo fermentativo de silagem de alfafa com elevada umidade. A população de BAL na planta e nas silagens de alfafa submetidas ou não ao emurhecimento é diversa em nível de espécies, o *Lactobacillus plantarum* é a espécie predominante e apresenta comportamento distinto ao longo dos períodos de fermentação nas silagens não emurhecidas e emurhecidas.

## ABSTRACT

AGARUSSI, Mariele Cristina Nascimento, M.Sc, Universidade federal de Viçosa, February 2015. **Effect of wilting and bacterial inoculant on the microbial population and fermentation profile of alfalfa silage in tropical conditions.** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-Adviser: Karina Guimarães Ribeiro.

We aim with this study to evaluate the fermentation characteristics, chemical composition and microbial populations of wilted or unwilted alfalfa silage treated with bacterial inoculant in different periods of fermentation as well as the isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria (LAB) from non-inoculated silage. We analyzed the data as a  $2 \times 2 \times 6$  factorial arrangement with the effects of wilting (W) (absence or presence), bacterial inoculant (I) (with and without) and period (P) (1, 3, 7, 14, 28 and 56 days), and their interaction in a completely randomized design with three replications. We harvested the alfalfa at 50 days of regrowth, chopped into particles of 1.5 cm and wilted for 6 hours in the field before ensiling. The commercial inoculant used was Sil-All® 4x4 W.S. (Alltech, Brazil), applied at the rate of  $10^5$  CFU/g of fresh forage. After the treatments forage was packed in plastic bags of  $25 \times 35$  cm and sealed by using vacuum sealer. Wilting of alfalfa reduced buffering capacity and water soluble carbohydrate concentrations and increased the dry matter (DM) content of the forage 133.9 g/kg DM to 233.4 g/kg DM before ensiling. There was effect ( $P < 0.05$ ) of W on the DM, crude protein, neutral detergent fiber and acid detergent insoluble nitrogen in the silages at 56 d. Populations of LAB and molds were not affected by any of the effects studied, however the populations of enterobacteria and yeasts were affected ( $P < 0.05$ ) by P. The pH and ammonia nitrogen concentration were affected by the interaction  $W \times P$  ( $P < 0.05$ ), registering lower values of these variables on wilted silages. There was effect ( $P < 0.05$ ) of the interaction  $W \times P$  on the concentrations of lactic, acetic and propionic acid, resulting in lower values of acetic acid in the wilted silages in all fermentation periods. Lower concentrations of propionic acid were found in wilted silages. Except for the 1st day of fermentation, we observed higher concentrations of lactic acid in the wilted silages, however in both wilted and unwilted silages the values decreased from the 7th d of ensiling. The addition of inoculant in presence or absence of wilting, does not improve the fermentation process of alfalfa silage with high moisture content. The populations of LAB in the wilted or unwilted fresh-alfalfa and in the silages are diverse in species levels and the

*Lactobacillus plantarum* is the predominant specie and presents different dynamic appearance over the fermentation period between unwilted and wilted silages.

## 1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de adequada fermentação durante a produção de silagens é função da quantidade e tipo de microrganismos presentes na planta, bem como do teor de matéria seca, da capacidade tampão e do teor de carboidratos solúveis em água da forragem (Melvin, 1965; Woolford, 1984). Aliado a essas características, a realização correta de todo o processo de ensilagem reflete na qualidade da silagem (Costa et al., 2001).

A alfafa (*Medicago sativa* L.) é uma leguminosa perene que apresenta alto valor nutricional, elevado teor de proteína, alta produtividade e digestibilidade e grande potencial de consumo animal (Carvalho e Vilela, 1994; Vilela, 2001), além de conter altas concentrações de vitaminas e minerais, contribuem também para a fixação simbiótica de nitrogênio no solo.

As melhores características nutricionais para ensilagem da alfafa estão presentes no início do estágio de florescimento, contudo, os baixos teores de matéria seca e de carboidratos solúveis em água, associados à alta capacidade tampão resultante dos elevados teores de proteínas e de matéria mineral no momento do corte (McAlliser et al., 1998), são fatores que dificultam a conservação da alfafa na forma de silagem. Nesse sentido, a realização do emurchecimento e o uso de aditivos microbianos têm sido propostos como alternativas para favorecer o processo fermentativo dessa cultura.

A redução no teor de umidade, através do emurchecimento, altera a concentração de substrato, que, juntamente com aumento do potencial osmótico, exerce efeitos variados nas populações de micro-organismos (Woolford, 1984) dependendo das condições meteorológicas no momento do processo e do tempo de secagem (Weise, 1969).

A quantidade, a diversidade e a atividade das bactérias lácticas (BAL) epífitas ditam o sentido da fermentação e as proporções dos ácidos orgânicos que serão produzidos, influenciando na qualidade da silagem (McDonald et al., 1991; Lin et al., 1992a). No entanto estudos que avaliaram o efeito do emurchecimento nessas bactérias são contraditórios.

Alguns estudos relatam o aumento da população de BAL na forragem emurchecida (Fenton, 1987, Muck, 1989, Tyrolova et al., 2012) no entanto, Ruser (1989) e Lin et al. (1992b) concluíram que o emurchecimento é capaz tanto de aumentar como reduzir a população de BAL em função da concentração destas no momento do corte.

A adição de aditivos microbianos contendo BAL homofermentativas, heterofermentativas, ou a combinação destas no processo de ensilagem, tem como objetivo inibir o crescimento de



micro-organismos aeróbios como as leveduras e anaeróbios como enterobactérias e clostrídeos, adicionar micro-organismos benéficos para dominar a fermentação, formar produtos finais que estimulam o consumo e a produção animal e melhorar a recuperação de matéria seca da forragem conservada (Kung Jr. et al., 2003).

Em geral, são observados efeitos positivos da adição de inoculantes na qualidade de silagens, evidenciados pela diminuição da proteólise inicial, aumento da taxa de declínio de pH, redução do pH final, aumento da produção de ácido lático e diminuição do nitrogênio não proteico (NNP) solúvel, o que assegura melhor qualidade fermentativa (Jones et al., 1992).

A falha dos inoculantes sobre o processo pode estar relacionada com a capacidade da bactéria inoculada crescer rapidamente na massa de forragem, da presença de substrato adequado e da população de bactérias epifíticas (Muck, 1988), podendo estar relacionada também ao princípio da especificidade entre a espécie forrageira e os micro-organismos presentes no inoculante.

O melhor entendimento do comportamento da cultura da alfafa, bem como o conhecimento das alterações na população microbiana existente, pode auxiliar na obtenção de estratégias que visem a ocorrência do processo fermentativo adequado, com o mínimo de fermentações secundárias e, como consequência, redução das perdas de nutrientes.

Devido a isso, o isolamento e a caracterização de BAL de forrageiras e silagens que possuam características desejáveis para melhorar o processo fermentativo, utilizando não somente características fenotípicas, mas também genéticas, podem contribuir posteriormente para o desenvolvimento de inoculantes adequados para cada planta com estirpes mais resistentes e competitivas, além de elevar o número de informações que esclareçam a dinâmica fermentativa desses materiais.

A hipótese neste trabalho é que o emurchecimento e a adição de inoculante à alfafa antes da ensilagem modificam o perfil fermentativo, a composição química e a população microbiana de suas silagens. Portanto, objetivou-se com este trabalho isolar, caracterizar e identificar BAL de silagens de alfafa produzidas em condições tropicais, bem como quantificar as populações microbianas e avaliar a composição química e as alterações no perfil fermentativo dessas silagens submetidas ao emurchecimento, tratadas ou não com inoculante bacteriano, em diferentes períodos de fermentação: 1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 *Local do experimento e condições climáticas*

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

### 2.2 *Delineamento experimental.*

Foi utilizado um esquema fatorial 2 x 2 x 6, ausência ou presença de emurchecimento (E), com e sem inoculante bacteriano (I) e 6 períodos de fermentação (P) (1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias), com três repetições, no delineamento inteiramente casualizado.

### 2.3 *Plantio, colheita e ensilagem da alfafa*

A alfafa cv. crioula foi colhida com 50 dias de rebrotação, no início do florescimento no setor de Forragicultura, do Departamento de Zootecnia da UFV, em uma área de 1000 m<sup>2</sup>.

A forragem foi cortada com segadora costal e parte desta foi emurchecida no campo, por 6 h, antes da ensilagem. Após esse período, a planta foi picada em partículas de 1,5 cm, em máquina picadeira estacionária, e ensilada em mini-silos constituídos de bags medindo 25,4 cm x 35,56 cm (Doug Care Equipment, Springville, CA). Em cada bag foram adicionados 500 g de forragem picada e a condição de anaerobiose no interior do mini-silo foi estabelecida utilizando seladora a vácuo. A forragem não emurchecida foi picada imediatamente após a colheita e ensilada conforme descrito acima.

O inoculante comercial utilizado foi o Sil-All® 4x4 W.S. (Alltech, Brasil) que apresenta em sua composição sacarose, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius subesp. Salivarius*, dióxido de silício, amilase, celulase, enzima hemicelulolítica e xilanase. O inoculante foi aplicado com o auxílio de um pulverizador manual na dosagem 10<sup>5</sup> unidade formadora de colônia (UFC)/g (5 g/t) de forragem. A mesma quantidade de água utilizada para diluição do inoculante foi aplicada nos tratamentos sem inoculante.

## 2.4 *Composição química*

Amostras da forragem emurhecidas e não emurhecidas, antes da ensilagem e das respectivas silagens, em cada período de fermentação foram submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada de ar a 55°C, por 72 h, e moídas em moinho tipo Willey, com peneira de 1 mm, para determinação dos teores de matéria seca (MS) pelo método 934,01 e proteína pelo método 984,13 como descrito pela AOAC (1990).

Apenas nas amostras da forragem e das silagens aos 56 dias de fermentação foram realizadas as análises de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) utilizando amilase termoestável e de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), ambas corrigidas para cinzas utilizando as técnicas descritas por Mertens (2002). A correção da FDN e do FDA para os compostos nitrogenados e a estimativa dos conteúdos de compostos nitrogenados insolúveis no detergente neutro (NIDN) e dos compostos insolúveis em detergente ácido (NIDA) foram feitos conforme Licitra et al. (1996).

Nas amostras da forragem foi determinada a capacidade tampão segundo a metodologia descrita por Playne e McDonald, (1996) e quantificada a concentração dos carboidratos solúveis em água segundo Deriaz, (1961).

## 2.5 *Perfil fermentativo*

Para realização do perfil fermentativo, 25 g de amostras de silagem de cada mini-silo foram homogeneizados em 225 mL de Ringer's solution estéril em liquidificador industrial durante 1 minuto. No extrato aquoso obtido foi determinado o pH utilizando-se potenciômetro. Após, 10 mL do extrato aquoso foram filtrados, acidificados com 3 gotas de ácido sulfúrico 50%, e armazenados a -20°C. Nesse extrato foi determinada a concentração de N-NH<sub>3</sub> através do método do fenol-hipoclorito (Weatherburn et al., 1967), quantificada através de procedimentos colorimétricos.

A análise dos ácidos orgânicos foi realizada em cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC). Para a realização da análise foi preparado um extrato utilizando-se 20 g de amostra fresca, diluídos em água deionizada (1:10) e homogeneizado por 1 min em liquidificador industrial. Após, a mistura foi filtrada em quatro camadas de gaze e uma alíquota de 20 mL desse

filtrado foi centrifugada a 25000 g por 20 minutos a -20°C (Filya et al., 2007), para quantificação dos ácidos orgânicos, segundo Siegfried et al. (1984).

Os ácidos orgânicos utilizados para calibração da curva padrão foram: ácido acético, ácido propiônico, ácido láctico e ácido butírico, todos na concentração inicial de 10 mM, com exceção do ácido acético, cuja concentração inicial foi de 20 mM. As amostras foram analisadas no cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific®) Dual acoplado a um detector de índice de refração (RI) Shodex RI-101, mantido a 45°C, com coluna de troca iônica Phenomenex Rezex ROA, 300 × 7,8 mm, mantida a 45°C. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 5 mM com fluxo de 0,7 mL/min.

## 2.6 *Quantificação das populações microbianas*

A partir dos extratos aquosos preparados para a determinação do perfil fermentativo foram realizadas diluições seriadas e plaqueadas pela técnica de pour plate em diferentes meios de cultivo para determinação da UFC da população de bactérias lácticas, enterobactérias, mofo e leveduras. O cultivo da população de BAL foi realizado em MRS ágar (Difco™ Lactobacilli MRS Agar ®) a 37°C por 48h; o cultivo de enterobactérias foi realizado em VRB ágar (Violet Red Bile) a 37°C por 24h; o cultivo de mofo e leveduras foi realizado em BDA (Batata Dextrose Ágar) acrescido de ácido tartárico 10 % a 25°C por 96h. O número de UFC foi determinado em placas contendo entre 30 a 300 colônias.

## 2.7 *Isolamento de bactérias lácticas*

As BAL foram isoladas das amostras da planta antes da ensilagem e das silagens sem inoculante bacteriano, emurhecidas ou não, nos diferentes períodos de fermentação (1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias). Para isso foi escolhida uma quantidade de colônias equivalente à raiz quadrada do valor total de UFC presentes nas placas, seguindo as recomendações do Bergey's Manual for Systematic Bacteriology (1986).

As colônias que apresentaram diferenças culturais foram estriadas em placas contendo MRS sólido acrescido de 0,04 g/L púrpura de bromocresol e 5,0 g/L carbonato de cálcio. Estas placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas em jarras de anaerobiose (GasPak™ Plus Anaerobic System, BBL, Franklin Lakes, NJ). As colônias selecionadas foram cultivadas em

caldo MRS (De Man, Rogosa e Sharpe, 1960), a 37°C por 48h para obtenção da suspensão de células. À suspensão de células foi adicionado glicerol 20% para a conservação das culturas a -20°C.

Os isolados foram preliminarmente avaliados quanto à coloração de gram, teste de catalase e produção de ácido em meio ágar MRS adicionado de púrpura de bromocresol. Os isolados caracterizados como gram positivos, catalase negativos e com capacidade de produção de ácido foram selecionados para realização dos demais testes de caracterização.

## 2.8 Caracterização de bactérias lácticas

As colônias de BAL selecionadas foram submetidas aos testes de crescimento em diferentes concentrações de sal (4,0 e 6,5% de NaCl), pH (3.5; 4.0; 4.5, 8.5) e temperatura (15°C e a 45°C), utilizando o meio caldo MRS. (Liu et al., 2012). Os isolados submetidos às diferentes concentrações de NaCl e aos diferentes pH foram incubados a 37°C. O ajuste do pH foi realizado utilizando-se soluções de NaOH (50%) e de HCl (50%). A avaliação do crescimento dos isolados, nas diferentes condições de cultivo, foi realizada após 24 h pela medida da absorbância a 630 nm, em espectrofotômetro (Thermo Scientific®).

Para a avaliação da produção de CO<sub>2</sub>, os isolados foram cultivados em caldo MRS, contendo tubos de Durham invertidos, e incubados a 37°C por 48 h. Foram considerados positivos os tubos de Durham com gás em seu interior (presença de bolha) e negativos os que não possuíam gás (Drosinos et al., 2007), caracterizando assim os isolados como heterofermentativo e homofermentativo, respectivamente.

A atividade antimicrobiana de cada cultura láctica sobre as bactérias indicadoras *Listeria monocytogenes* 7644, *Listeria monocytogenes* 19117 e *Escherichia coli* foi realizada conforme o método de atividade diferida proposto por Tagg et al. (1976). Após duas ativações consecutivas, a densidade ótica dos isolados foi ajustada para 0,4 a 0,5 nm, e, na sequência, foram aplicados às placas de ágar MRS, microgotas de 5 µl, equidistantes entre si, e incubadas a 37°C por 24 h, em jaras de anaerobiose (GasPak TM Plus Anaerobic System, BBL, Franklin Lakes, NJ). Após esse período foi vertida nas placas uma sobrecamada de 6 mL de BHI ágar semi-sólido, mantido em banho maria a 47°C, contendo 300 µl da cultura indicadora e incubadas a 37°C por 24 h, em aerobiose. Após esse período foram analisadas quanto à formação de halos de inibição ao redor das microgotas.

Os halos foram medidos e a zona de inibição correspondeu à medida do diâmetro externo do halo de inibição da colônia subtraído do diâmetro da colônia. A análise foi conduzida em duplicata e a medida do halo de inibição foi uma média resultante dos halos.

## 2.9 *Identificação das bactérias lácticas*

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

As sequências do gene 16S rDNA foi amplificada por PCR. Os primers P027F (GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT) (Heuer et al., 1997) foram utilizados na PCR para amplificar a sequência do 16S rDNA. A reação PCR foi realizada em tubos microcentrífuga de capacidade de 0,2 mL contendo 50 µL da mistura de reação: DNA (aproximadamente 60 ng); tampão 10X (Tris-HCl 0,1 mol l<sup>-1</sup>, pH 8,0, KCl 0,5 mol l<sup>-1</sup>); MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol l<sup>-1</sup>, pH 8,0); dNTP mix (Promega, Madison WI USA); Taq polimerase (Promega) (1 U); primer p027f (0,6 µmol l<sup>-1</sup>) e 1492 (0,6 µmol l<sup>-1</sup>). O volume da mistura de reação foi completado para 50 µL com água milli-Q autoclavada. A PCR foi realizada em termociclador (Eppendorff®) e as condições de reações empregadas foram: 94°C/5 minutos; 30 ciclos (desnaturação: 94°C/30 segundos; 60°C por 30 segundos); polimerização: 72°C/2 minutos; extensão final: 72°C/5 minutos. Uma alíquota de 4 µL da mistura de reação PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,4 %) em tampão de Tris Borato EDTA (TBE). O gel foi corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio e as bandas foram visualizadas sobre iluminação UV. O produto PCR foi encaminhado à empresa Macrogen, na Coreia, para purificação e sequenciamento das amostras.

As sequências dos isolados foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados do GenBank, e alinhadas usando o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search

Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos. As sequências do gene 16S rDNA que apresentaram similaridade igual ou maior que 97% foram consideradas como pertencentes a uma mesma Unidade Taxonômica Operacional (Altschul et al., 1990).

### 2.10 *Filogenia molecular*

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

### 2.11 *BOX-PCR*

A técnica de BOX-PCR foi utilizada para avaliar a diversidade genética dos isolados de *Lactobacillus plantarum* obtidos de silagem de alfafa. A reação de BOX-PCR foi realizada utilizando o primer BOX-A1. As condições de amplificação do DNA (95°C por 7 min, seguido de 30 ciclos de 90°C por 30 s, 52°C por 1 min, 65°C por 8 min, e 65°C por 16 min (Thermal Cycler, Techne TC-512, Analítica) foram as mesmas adotadas por Koeth et al. (1995) e os produtos do PCR foram separados em gel de agarose 1,6% a 60 volts por aproximadamente 2 h. O fingerprint por BOX-PCR foi documentado usando o sistema de visualização de imagem (KASVI, K33-312).

### 2.12 *Análises estatísticas*

O emurchecimento, o inoculante e os períodos de fermentação, bem como, a interação entre os fatores, foram considerados efeitos fixos no modelo, utilizando PROC MIXED do SAS. Foi utilizado um esquema de medidas repetidas no tempo (Littell et al., 1998), sendo os períodos de fermentação (1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias após ensilagem) repetidos em cada unidade experimental (mini-silo). As comparações entre os períodos de fermentação seguiram a decomposição ortogonal da soma de quadrados associada às fontes de variação em efeitos linear, quadrático e

cúbico e foram conduzidas utilizando o PROC REG do SAS (versão 9.1), em caso de interação significativa utilizou-se o procedimento SLICE do SAS (versão 9.1) Assumiu-se a homogeneidade das variâncias entre tratamentos e os graus de liberdade foram estimados pelo método de Kenward-Roger. Para avaliação dos efeitos de inoculante e de emurchecimento, as diferenças entre as médias de mínimos quadrados estimadas, foram determinadas utilizando-se a opção Diferença Preditada (DIFF) do PROC MIXED do SAS (versão 9.0), sendo considerado 0,05 como o nível de probabilidade máximo tolerado para ocorrência do erro tipo I.

A composição química das silagens, avaliada apenas aos 56 dias de fermentação, também foi comparada utilizando-se as diferenças entre as médias de mínimos quadrados estimadas. Para o caso de interação significativa entre os fatores, os mesmos foram desdobrados e as médias foram comparadas dentro de cada fator, conforme descrito acima. Para as variáveis microbiológicas os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-wilk, utilizando-se 0,05 como nível crítico para ocorrência do erro tipo I, para verificar a adequação. Em caso de adequação, os dados seguiram os procedimentos descritos acima para as demais variáveis. Em caso de não ajustamento à distribuição normal, o modelo avaliado incluiu os efeitos de inoculante, emurchecimento, período de fermentação e interação entre os mesmos, atribuindo-se aos dados a distribuição de Poisson, por intermédio do PROC GENMOD dos SAS (versão 9.1).



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Composição química e populações microbianas da alfafa antes da ensilagem

A composição química, o pH e a população dos micro-organismos da alfafa antes da ensilagem são mostrados nas Tabelas 1.

**Tabela 1.** Caracterização da composição química, do pH e da população microbiana da alfafa antes da ensilagem.

Itens <sup>1</sup>	Sem emurchecimento		Com emurchecimento		EPM <sup>2</sup>
	Sem inoculante	Com inoculante	Sem inoculante	Com inoculante	
MS (g/kg MN)	130,4	137,4	231,4	235,4	24,9
PB (g/kg MS)	174,4	185,4	163,0	149,6	6,6
NIDA (g/kg N)	82,9	88,8	75,6	80,0	0,2
FDNcp (g/kg MS)	353,5	334,5	336,0	345,2	3,8
HEM (g/kg MS)	100,4	99,5	84,3	121,3	0,6
CHO sol (g/kg MS)	29,7	26,1	27,4	24,2	10,0
CT (mEq/kg MS)	439,8	417,2	301,1	290,6	19,3
pH	6,07	6,10	6,13	6,16	0,02
Bactérias lácticas (log UFC/g)	5,16	5,40	6,89	6,87	0,4
Enterobactérias (log UFC/g)	6,20	6,32	6,41	6,29	0,04
Mofos (log UFC/g)	3,48	4,15	3,80	3,70	0,1
Leveduras (log UFC/g)	5,07	5,40	5,06	4,96	0,08

MS = Matéria seca; PB = Proteína bruta; NIDA = Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; FDNcp = Fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; HEM= Hemicelulose; CHO sol = Carboidratos solúveis em água; CT= Capacidade tampão; <sup>2</sup>EPM= Erro padrão da média.

#### 3.2 Populações microbianas e perfil fermentativo

As populações de BAL e mofos não foram afetadas pelos fatores estudados, já as enterobactérias e leveduras foram afetadas ( $P < 0,05$ ) pelo período de fermentação (Tabela 2). As populações microbianas encontram-se na Tabela 3. Observou-se maior contagem de enterobactérias e leveduras no primeiro dia após a ensilagem, sendo que a população de leveduras não diferiu daquela com 28 dias de fermentação ( $P > 0,05$ ) (Figura 1).

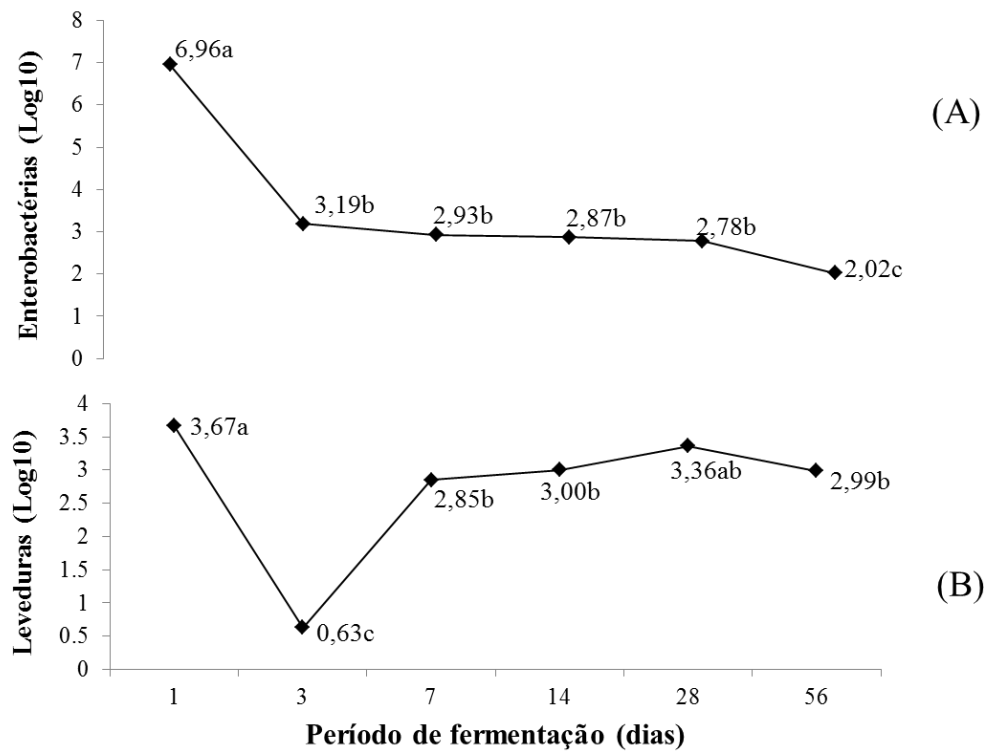
**Tabela 2.** P-valor e erro padrão da média das variáveis do perfil fermentativo de silagens de alfafa submetidas ou não ao emurchecimento e a inoculação microbiana em diferentes dias de fermentação.

Itens	P-valor							EPM <sup>9</sup>	T.N. <sup>10</sup>
	E <sup>2</sup>	I <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	E×I <sup>5</sup>	E×P <sup>6</sup>	I×P <sup>7</sup>	E×I×P <sup>8</sup>		
pH	<0,01	0,03	<0,01	0,27	<0,01	0,82	0,29	0,02	-
N-NH <sub>3</sub>	<0,01	0,56	<0,01	0,89	<0,01	0,44	0,67	58,0	-
Bactérias lácticas	0,84	0,9	0,9	0,99	0,99	0,99	0,99	0,04	<0,01
Enterobactérias	0,48	0,33	<0,01	0,57	0,82	0,98	0,92	0,20	<0,01
Mofos	0,50	0,41	0,98	0,92	0,99	0,99	0,98	0,14	<0,01
Leveduras	0,15	0,30	<0,01	0,48	0,09	0,09	0,99	0,08	<0,01
Ácido acético	<0,01	0,73	<0,01	0,86	<0,01	0,98	0,63	23,0	-
Ácido propiônico	0,02	0,07	0,02	0,24	0,04	0,06	0,09	1,6	-
Ácido lático	<0,01	<0,01	<0,01	0,14	<0,01	0,86	0,37	1,4	-

<sup>2</sup>E = efeito do emurchecimento; <sup>3</sup>I= efeito do inoculante; <sup>4</sup>P= efeito do período; <sup>5</sup>E×I= efeito da interação emurchecimento e inoculante; <sup>6</sup>E×P= efeito da interação emurchecimento e período; <sup>7</sup>I×P= efeito da interação inoculante e período; <sup>8</sup>E×I×P= efeito da interação emurchecimento, inoculante e período; <sup>9</sup>EPM= Erro padrão da média <sup>10</sup>T.N. = Teste de normalidade (Hipótese testada pelo teste de Shapiro-Wilk com  $\alpha = 0,05$ , sendo H<sub>0</sub>: Distribuição normal e H<sub>1</sub>: não H<sub>0</sub>)

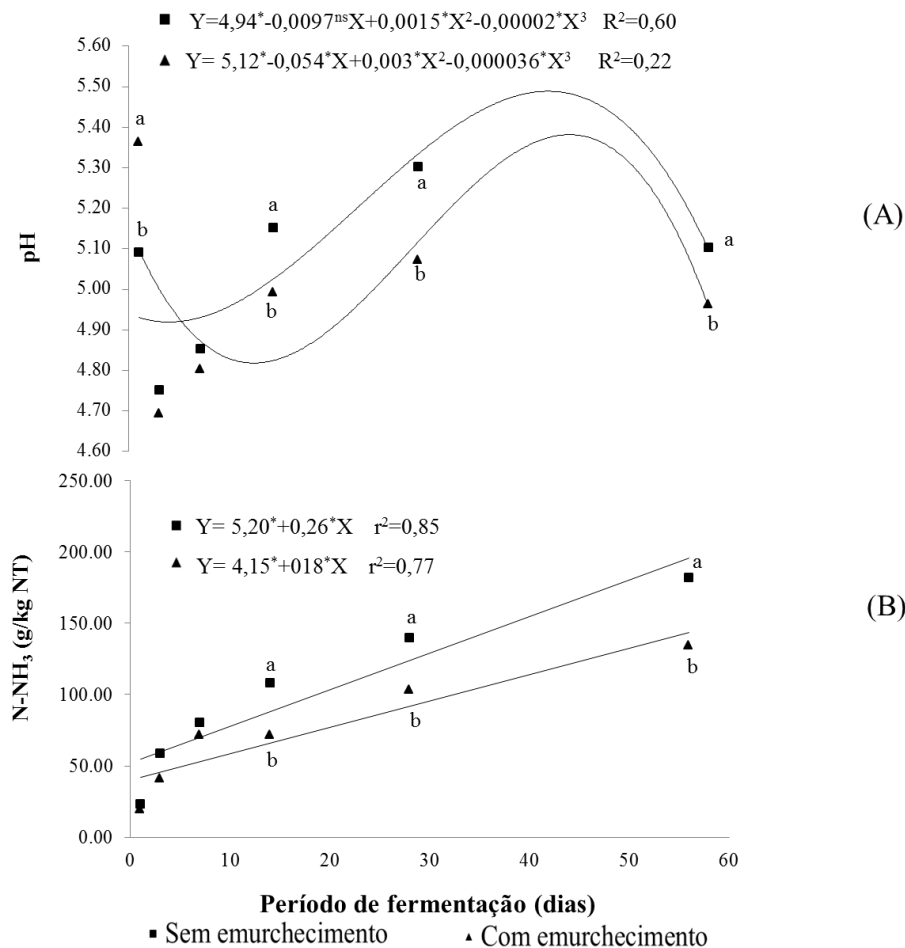
**Tabela 3.** Populações microbianas e variáveis do perfil fermentativo de silagens de alfafa submetidas ou não ao emurchecimento e a inoculação microbiana em diferentes dias de fermentação.

Itens	Sem emurchecimento		Com emurchecimento	
	Sem inoculante	Com inoculante	Sem inoculante	Com inoculante
pH	5,05	5,04	4,99	4,96
N-NH <sub>3</sub> (g/kg NT)	9,79	9,93	7,28	7,50
Bactérias lácticas (log UFC/g)	8,55	8,60	8,69	8,73
Enterobactérias (log UFC/g)	3,96	3,26	3,39	3,23
Mofos (log UFC/g)	2,93	2,56	2,63	2,36
Leveduras (log UFC/g)	3,40	2,66	2,52	2,43
Ácido acético (g/kg MS)	4,56	4,57	2,92	2,98
Ácido propiônico (g/kg MS)	0,48	0,45	0,28	0,42
Ácido lático (g/kg MS)	2,49	2,61	2,77	3,10



**Figura 1.** Contagem da população de enterobactérias (A) e leveduras (B) em silagens de alfafa em função do período de fermentação.

Foi observado efeito de inoculante e da interação  $E \times P$  ( $P < 0,05$ ), sobre o pH das silagens (Tabela 3). Embora o pH das silagens tenha sido afetado pelo inoculante, biologicamente a diferença entre silagens não inoculadas (5,02) e inoculadas (5,00) não é relevante. O emurhecimento proporcionou silagens com maiores pH apenas no primeiro dia de fermentação (Figura 2). A concentração de  $N-NH_3$  também foi afetada ( $P < 0,05$ ) pela da interação  $E \times P$ , resultando em menores concentrações de  $N-NH_3$  nas silagens emurhecidas (Figura 2).

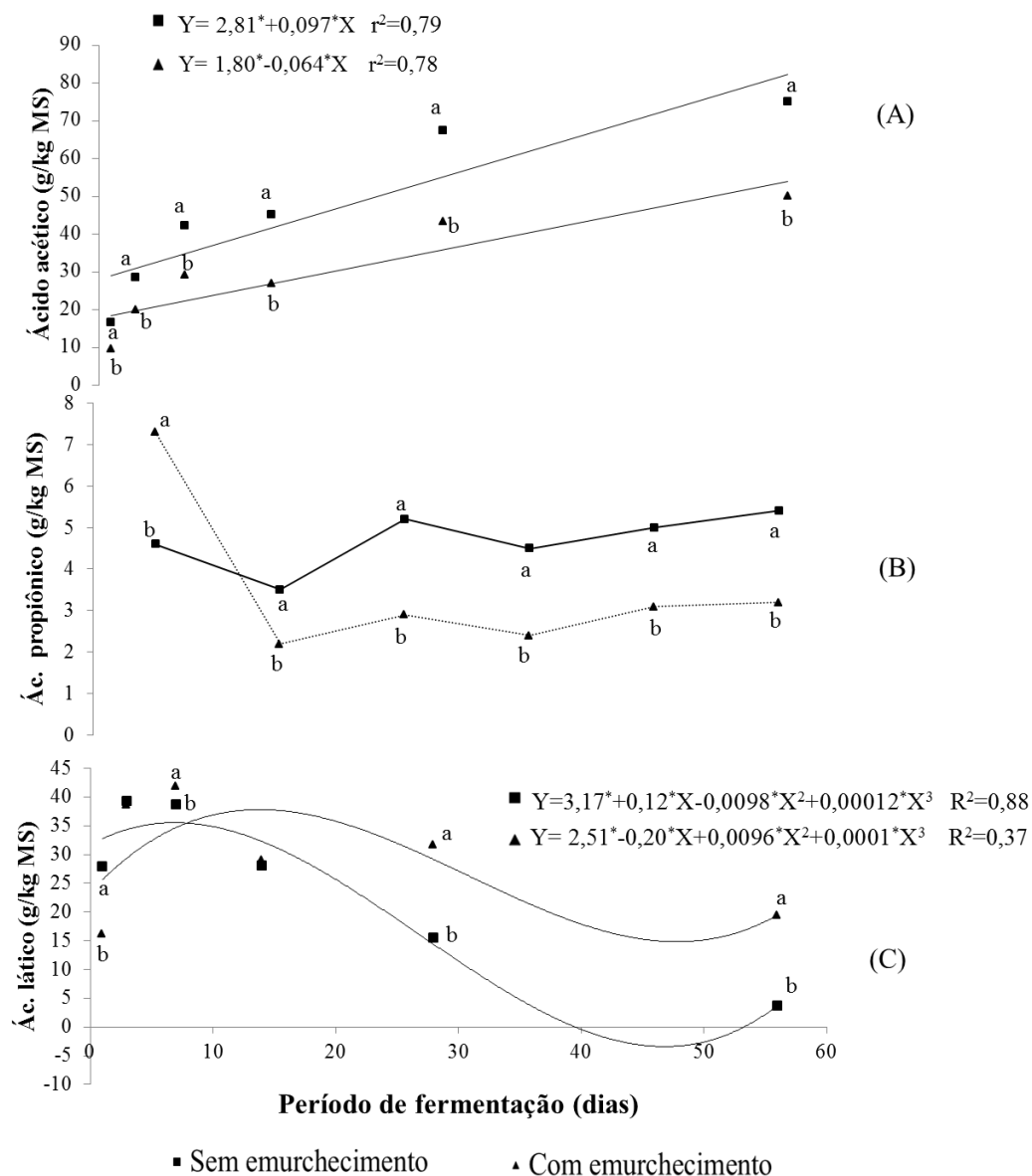


**Figura 2.** Comportamento do pH (A) e da concentração de N-NH<sub>3</sub> (B) das silagens em função do período de fermentação. Médias seguidas por letras diferentes diferem quanto ao emurchecimento, \* P < 0,05

O conteúdo de ácidos orgânicos das silagens foi afetado (P<0,05) pela interação E × P. (Tabela 3). Foi observado efeito linear crescente de período de fermentação sobre as concentrações de ácido acético (Figura 3), com menores valores nas silagens emurchecidas. As silagens emurchecidas apresentaram maiores concentrações de ácido propiônico apenas no 1º dia de fermentação. A partir do 3º dia foi registrado maior concentração deste ácido nas silagens não emurchecidas (Figura 3).

O emurchecimento não influenciou nas concentrações de ácido láctico no 3º e 14º dia após a ensilagem (Figura 3). Excetuando o 1º dia de fermentação, observou-se maiores concentrações de ácido láctico nas silagens emurchecidas, no entanto em ambas as silagens ocorreram decréscimo nos valores a partir do 7º dia após a ensilagem. Foi observado também efeito de

inoculante para este ácido embora biologicamente a diferença entre silagens não inoculadas (2,63) e inoculadas (2,85) não é relevante.



**Figura 3.** Concentração de ácido acético (A), ácido propiônico (B) e ácido láctico (C) de silagens de alfafa em função do período de fermentação. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si quanto ao emurchecimento, \*P < 0,05

### 3.3 Composição química após 56 dias de fermentação

Não houve efeito da interação ExI ( $P>0,05$ ) sobre a composição química da silagem, aos 56 dias de fermentação. No entanto, apenas a variável hemicelulose não foi afetada ( $P>0,05$ ) pelo emurhecimento (Tabela 4).

**Tabela 4.** Composição química das silagens de alfafa aos 56 dias de fermentação.

Inoculante	Emurhecimento		Média	P-valor			EPM <sup>9</sup>
	Sem	Com		E <sup>6</sup>	I <sup>7</sup>	E×I <sup>8</sup>	
	MS <sup>1</sup> (g/kg MS)			<0,01	0,89	0,44	14,8
Sem	136,7	223,8	180,2				
Com	128,8	234,9	181,8				
Média	132,8	229,3					
	PB <sup>2</sup> (g/kg MS)			0,02	0,78	0,20	1,4
Sem	162,5	153,0	157,7				
Com	158,7	155,5	157,1				
Média	160,6	154,2					
	NIDA <sup>3</sup> (g/kg N)			<0,01	0,0519	0,10	2,9
Sem	82,2	70,0	76,0				
Com	81,1	59,7	70,3				
Média	81,6	64,7					
	FDN <sup>4</sup> (g/kg MS)			<0,01	0,57	0,46	6,3
Sem	359,2	318,0	338,6				
Com	363,6	317,0	340,5				
Média	361,4	317,7					
	HEM <sup>5</sup> (g/kg MS) <sup>6</sup>			0,81	0,1	0,48	0,2
Sem	54,7	50,7	55,9				
Com	67,1	60,2	64,7				
Média	60,9	50,9					

<sup>1</sup>MS = Matéria seca; <sup>2</sup>PB = Proteína bruta; <sup>3</sup>NIDA = Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; <sup>4</sup>FDN = Fibra insolúvel em detergente neutro; <sup>5</sup>Hem=Hemicelulose; <sup>6</sup>E = Emurhecimento; <sup>7</sup>I= Inoculante; <sup>8</sup>E×I= Interação emurhecimento e inoculante; <sup>9</sup>EPM= Erro padrão da média.

### 3.4 Identificação das bactérias lácticas.

Dos 138 isolados identificados pelo sequenciamento parcial do gene 16S rDNA (Tabela 5), 120 apresentaram similaridade ( $\geq 97\%$ ) com sequências de outras BAL pertencentes ao banco de dados do Genbank. A maioria dos isolados identificados (112) apresentou sequências com alta similaridade de bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*.

O *L. plantarum* foi a espécie predominante, sendo 55% destes originados das silagens emurchecidas. Outras espécies do gênero foram encontradas em menor quantidade, como o *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. curvatus* e *L. acidipiscis*. Espécies de outros gêneros de bactérias como a *Weissella paramesenteroides*, *Weissella cibaria*, *Weissella hellenica*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Enterococcus gallinarum* também foram identificadas.

**Tabela 5.** Identificação das sequências do produto PCR do 16S rDNA dos isolados.

Isolados	Estirpe referente	Identidade (%)	Número de acesso
0.1 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	JX003604.1
0.2 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	HM101324.1
0.4 SE	<i>Uncultured bacterium clone</i>	94%	AF371493.1
0.5 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	KJ994448.1
0.7 SE	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	98%	JQ446485.1
0.9 SE	<i>Lactobacillus pentosus</i>	98%	JQ288726.1
0.10 SE	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	97%	KJ802481.1
0.2 E	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98%	KM496471.1
0.4 E	<i>Lactobacillus sp.</i>	75%	EU676340.1
0.5 E	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99%	AB598954.1
0.7 E	<i>Pediococcus sp.</i>	99%	KJ610830.1
0.8 E	<i>Enterococcus gallinarum</i>	98%	KC707581.1
0.10 E	<i>Uncultured bacterium clone</i>	98%	GQ071990.1
1.1 SE	<i>Weissella cibaria</i>	98%	AB510754.1
1.3 SE	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99%	KJ729064.1

**Tabela 5.** Identificação das sequências do produto PCR do 16S rDNA dos isolados (cont.).

Isolados	Estirpe referente	Identidade (%)	Número de acesso
1.4 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	JN573605.2
1.5 SE	<i>Weissella hellenica</i>	98%	AB621968.1
1.7 SE	<i>Weissella sp.</i>	98%	KM088091.1
1.9 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ026590.1
1.10 SE	<i>Weissella paramesenteroides</i>	98%	KJ729064.1
1.11 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	KM670024.1
1.12 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ026590.1
1.13 SE	<i>Weissella cibaria</i>	98%	HF562960.1
1.15 SE	<i>Weissella paramesenteroides</i>	97%	KJ830712.1
1.3 E	<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i>	98%	KJ026598.1
1.4 E	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	98%	KJ802481.1
1.5 E	<i>Weissella cibaria</i>	99%	HF562960.1
1.7 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ026590.1
1.8 E	<i>Weissella paramesenteroides</i>	97%	KJ830712.1
1.9 E	<i>Weissella cibaria</i>	97%	HF562960
1.11 E	<i>Weissella paramesenteroides</i>	97%	KJ830712.1
1.12 E	<i>Weissella paramesenteroides</i>	98%	KJ830712.1
1.13 E	<i>Lactobacillus pentosus</i>	97%	KC422317.1
1.14 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KM670024.1
3.1 SE	<i>Uncultured Lactobacillus sp. clone</i>	99%	KM389621.1
3.2 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	AB980951.1
3.3 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	KJ026590.1
3.4 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	KJ026590.1
3.5 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	KJ026590.1
3.6 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ026590.1
3.7 SE	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	98%	KF013201.1
3.8 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	KM200717.1
3.9 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ026590.1
3.10 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	KJ026590.1



**Tabela 5.** Identificação das sequências do produto PCR do 16S rDNA dos isolados (cont.).

Isolados	Estirpe referente	Identidade (%)	Número de acesso
3.11 SE	<i>Weissella paramesenteroides</i>	98%	KJ830712.1
3.12 SE	<i>Lactobacillus brevis</i>	97%	KJ994469.1
3.13 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	JX003604.1
3.14 SE	<i>Uncultured bacterium clone</i>	97%	HM754420.1
3.15 SE	<i>Pediococcus acidilactici</i>	82%	JN942103.1
3.1 E	<i>Lactobacillus pentosus</i>	98%	JQ288726.1
3.2 E	<i>Lactobacillus pentosus</i>	98%	KC422317.1
3.3 E	<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i>	97%	KJ026598.1
3.4 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	KF245560.1
3.5 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	KJ026590.1
3.6 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ026590.1
3.7 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	KM200717.1
3.8 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	KM670024.1
3.9 E	<i>Lactobacillus plantarum subsp. Argentoratensis</i>	98%	AB598953.1
3.10 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	KJ026590.1
3.11 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ026590.1
3.12 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ152777.1
3.13 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ026590.1
3.14 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ026587.1
3.15 E	<i>Lactobacillus pentosus</i>	96%	JQ288726.1
7.2 SE	<i>Uncultured Lactobacillus sp. clone</i>	99%	KM389621.1
7.3 SE	<i>Lactobacillus casei</i>	97%	KJ764639.1
7.4 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	KM670024.1
7.5 SE	<i>Uncultured Lactobacillus sp. clone</i>	97%	KM389621.1
7.6 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	KJ026590.1
7.8 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	KJ994471.1
7.9 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95%	JX003604.1
7.10 SE	<i>Uncultured Lactobacillus sp. clone</i>	97%	KM389621.1
7.1 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	JX003604.1

**Tabela 5.** Identificação das sequências do produto PCR do 16S rDNA dos isolados (cont.).

Isolados	Estirpe referente	Identidade (%)	Número de acesso
7.2 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	KJ994471.1
7.4 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	JX003604.1
7.5 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ994400.1
7.6 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95%	KJ026590.1
7.8 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	KJ026590.1
7.10 E	<i>Lactobacillus sp.</i>	99%	HQ728334.1
7.11 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	KJ026587.1
14.2 SE	<i>Lactobacillus pentosus</i>	97%	JQ288726.1
14.7 SE	<i>Lactobacillus pentosus</i>	97%	JQ288726.1
14.13 SE	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	98%	KF013201.1
14.14 SE	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	98%	KF013201.1
14.15 SE	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	97%	JQ322223.1
14.16 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ994448.1
14.1 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ994471.1
14.2 E	<i>Lactobacillus pentosus</i>	97%	KC422317.1
14.3 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	KJ026590.1
14.5 E	<i>Lactobacillus paraplanarum</i>	97%	KJ802481.1
14.7 E	<i>Lactobacillus paraplanarum</i>	98%	KJ802481.1
14.10 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ160192.1
14.11 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	KJ026590.1
14.12 E	<i>Uncultured Lactobacillus sp. clone</i>	98%	KM389621.1
14.15 E	<i>Lactobacillus paraplanarum</i>	99%	KJ802481.1
14.16 E	<i>Lactobacillus paraplanarum</i>	97%	KJ802481.1
14.18 E	<i>Uncultured Lactobacillus sp. clone</i>	99%	AB969778.1
14.19 E	<i>Lactobacillus paraplanarum</i>	97%	KJ802481.1
14.20 E	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99%	JQ288726.1
28.1 SE	<i>Lactobacillus paraplanarum</i>	97%	KJ802481.1
28.5 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	KJ026590.1
28.6 SE	<i>Lactobacillus curvatus</i>	98%	JX979220.1
28.7 SE	<i>Lactobacillus paraplanarum</i>	98%	KJ802481.1

**Tabela 5.** Identificação das sequências do produto PCR do 16S rDNA dos isolados (cont.).

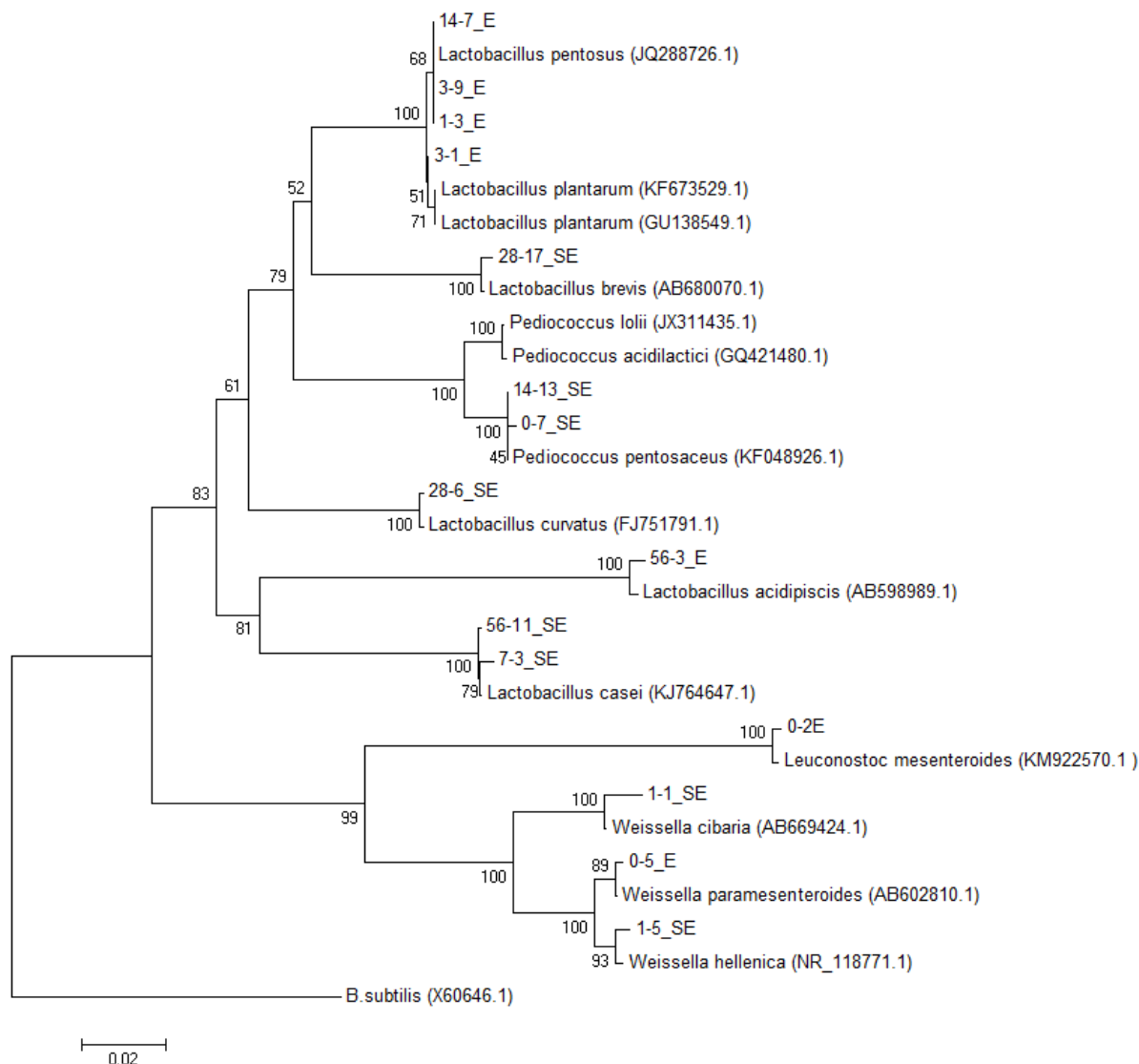
Isolados	Estirpe referente	Identidade (%)	Número de acesso
28.8 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	JX003604.1
28.9 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	KJ160209.1
28.12 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	JX003604.1
28.14 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	KM670024.1
28.17 SE	<i>Lactobacillus brevis</i>	99%	KM454423.1
28.1 E	<i>Lactobacillus brevis</i>	98%	KM454423.1
28.2 E	<i>Lactobacillus brevis</i>	98%	KJ994371.1
28.3 E	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99%	JQ288726.1
28.4 E	<i>Lactobacillus brevis</i>	98%	KJ994371.1
28.5 E	<i>Lactobacillus pentosus</i>	97%	JQ288726.1
28.6 E	<i>Lactobacillus pentosus</i>	97%	JQ288726.1
28.7 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	JX003604.1
28.8 E	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	98%	KJ802481.1
28.9 E	<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i>	97%	KJ026598.1
28.11 E	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	98%	KJ802481.1
28.12 E	<i>Lactobacillus paracasei</i>	98%	KC456365.1
28.14 E	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	97%	KJ802481.1
28.15 E	<i>Lactobacillus brevis</i>	99%	KJ095648.1
28.16 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	JX003604.1
28.19 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	KJ994448.1
56.1 SE	<i>Lactobacillus casei</i>	98%	KJ764639.1
56.5 SE	<i>Lactobacillus casei</i>	98%	KJ764639.1
56.6 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ026590.1
56.11 SE	<i>Lactobacillus paracasei</i>	98%	KF030765.1
56.12 SE	<i>Lactobacillus casei</i>	97%	KJ764639.1
56.13 SE	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96%	HM101327.1
56.16 SE	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	99%	KJ802481.1
56.3 E	<i>Lactobacillus acidipiscis</i> ;	99%	JQ043376.1
56.4 E	<i>Lactobacillus casei</i>	99%	KM350168.1

**Tabela 5.** Identificação das sequências do produto PCR do 16S rDNA dos isolados (cont.).

Isolados	Estirpe referente	Identidade (%)	Número de acesso
56.7 E	<i>Lactobacillus casei</i>	99%	HG798492.1
56.10 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	KM670024.1
56.11 E	<i>Lactobacillus casei</i>	97%	KJ764639.1
56.13 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	HM101314.1
56.14 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ994448.1
56.15 E	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	KJ026590.1

### 3.5 Análise filogenética.

A reconstrução da árvore filogenética pelo método de “Neighbor-joining” mostrou que os isolados selecionados (0.7SE; 0.2E; 0.5E; 1.1SE; 1.5SE; 1.3E; 3.1E; 3.9E; 7.3SE; 14.7E; 28.6 SE; 28.17SE; 56.11SE; 56.3E; 14.13SE) são estreitamente relacionados com as sequências de outras BAL pertencentes ao banco de dados do GenBank (Figura 4), suportando um valor de bootstrap igual ou maior a 70 %.

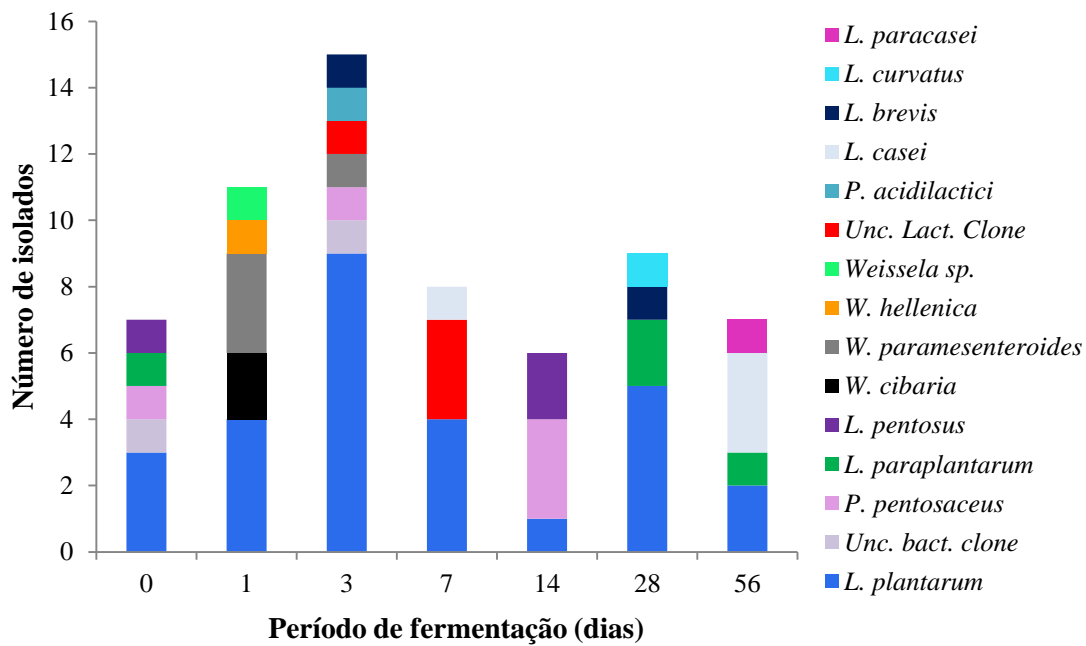


**Figura 4.** Árvore filogenética de sequências parciais do 16S rDNA de estirpes isoladas e sequencias de bactérias identificadas pertencentes ao banco de dados de nucleotídeos do Genbank. *Bacillus subtilis* (X60646.1) foi utilizado como grupo externo. A árvore foi reconstruída pelo método “Neighbor-joining”, e os números nos nós das ramificações da árvore referem aos valores de *bootstrap* (expresso como porcentagem de 1000 réplicas).

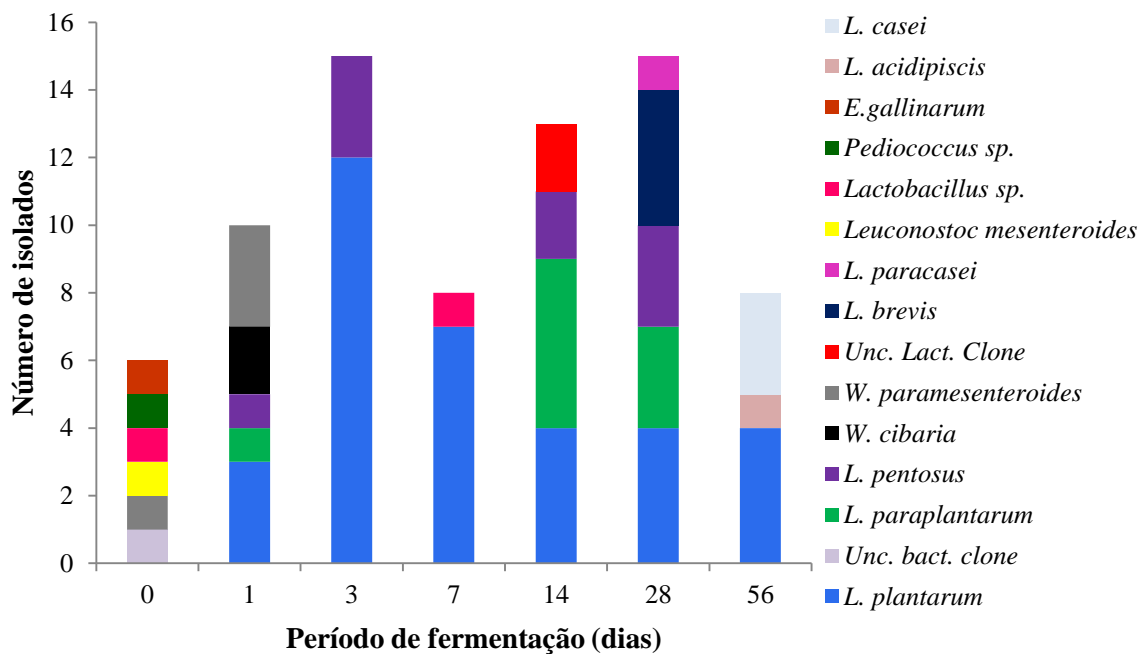
### 3.6 Sucessão das bactérias lácticas

A sucessão das BAL isoladas da planta e das silagens emurchecidas ou não, nos diferentes períodos de fermentação, sem inoculante, encontram-se nas Figuras 5 e 6. Foi observado a presença de *L. plantarum* em todos os períodos de fermentação, excetuando na planta emurchecida antes da ensilagem. Os isolados obtidos da forragem emurchecida no dia da

ensilagem apresentaram maior diversidade de espécies. No primeiro dia de fermentação observou-se a dominância do gênero *Weissella* (*W. cibaria* e *W. paramesenteroides*) em ambas as silagens. No terceiro dia de fermentação, a maioria dos isolados das silagens foi identificado como *L. plantarum* e as espécies *L. brevis* e *P. acidilactici* foram encontradas nas silagens sem emurchecimento. No sétimo dia de fermentação grande parte dos isolados das silagens não emurchecida foi classificada como *Lactobacillus* não cultiváveis. Aos 14 dias de fermentação foi encontrado um numero relevante de bactérias pertencentes às espécies *L. pentosus* e *L. paraplantarum* nas silagens emurchecidas e apenas na silagem não emurchecida encontrou-se o *P. pentosaceus*. Observou-se em adicional no dia 28, as espécies *L. brevis* em ambas as silagens, o *L. curvatus* na silagem não emurchecida e *L. paracasei* na emurchecida. No último dia de fermentação foi observado aumento do *L. casei* em ambas as silagens e o *L. acidipiscis* foi encontrado nas silagens emurchecidas.



**Figura 5.** Sucessão de bactérias lácticas na planta (dia 0) e em silagem de alfafa não emurcheçada nos diferentes períodos de fermentação.

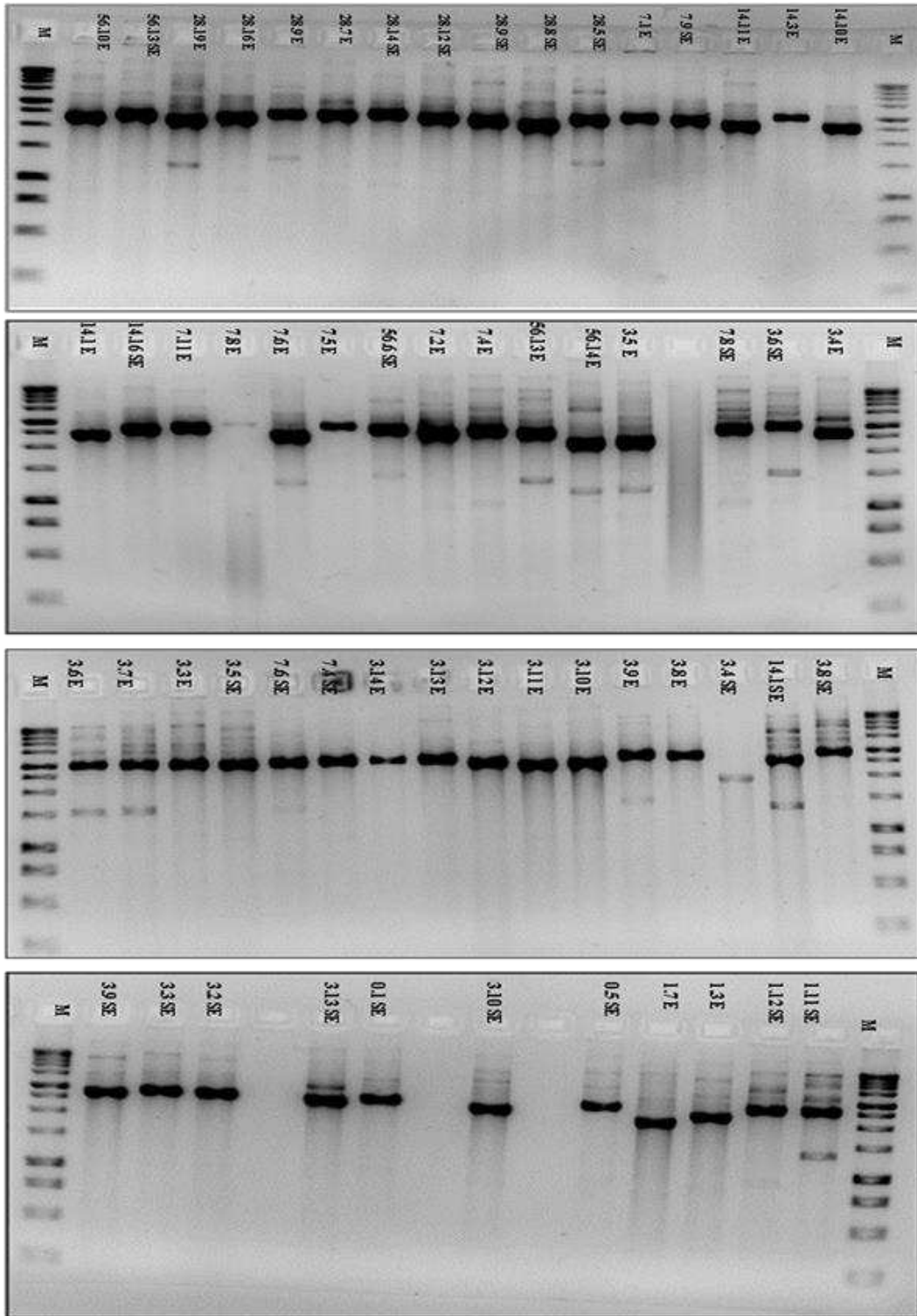


**Figura 6.** Sucessão de bactérias lácticas na planta (dia 0) e em silagem de alfafa emurcheçada nos diferentes períodos de fermentação.

### 3.7 *BOX PCR*

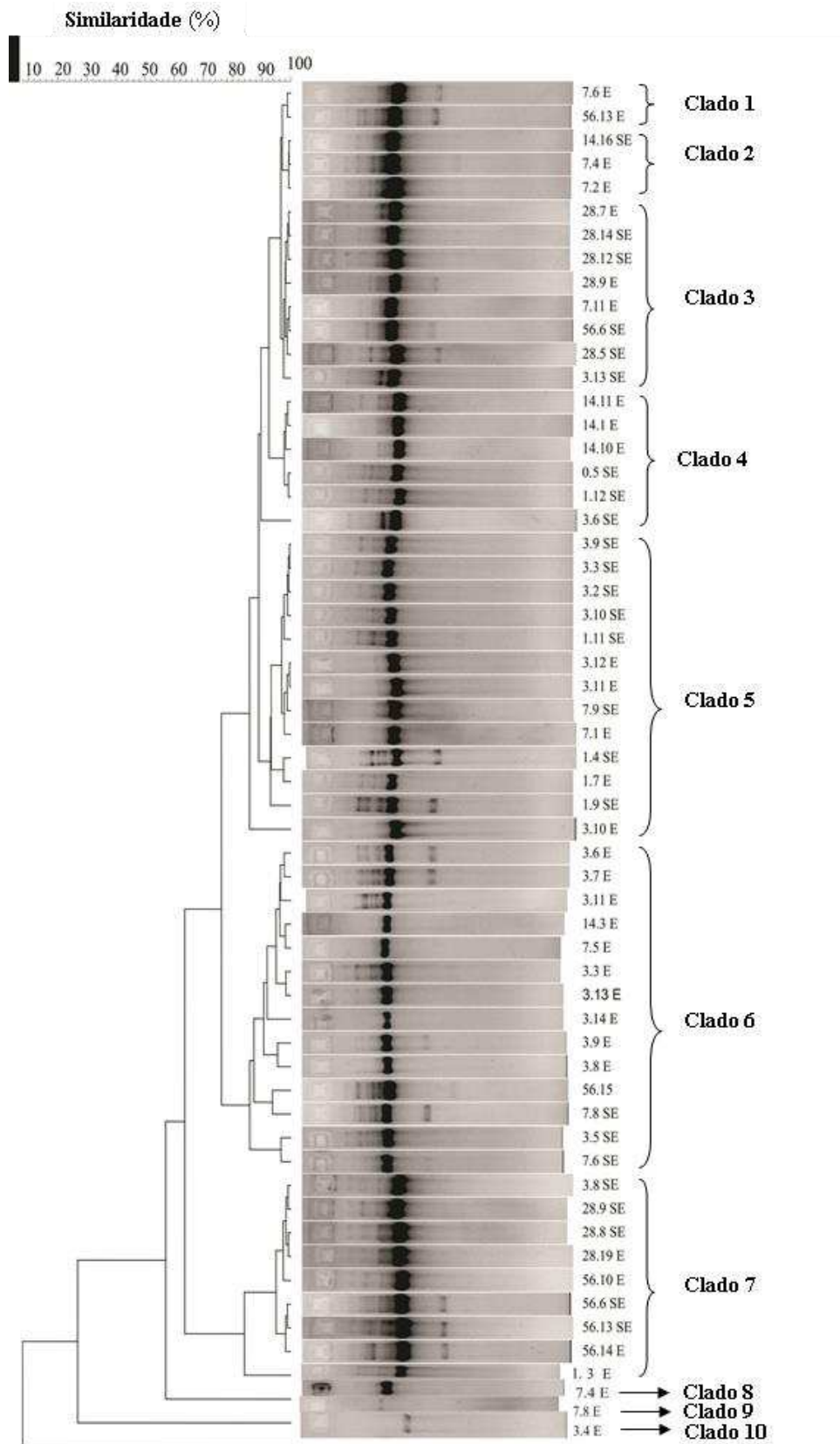
A análise da diversidade genética dos 58 isolados de *L. plantarum* selecionados anteriormente foi realizada pelo fingerprint por BOX-PCR. Uma variedade de produtos de PCR foi observada quando sequências repetitivas de DNA (BOX) foram amplificadas, que variaram aproximadamente entre 1000 a 10000 pb (Figura 7).





**Figura 7.** Análise da diversidade genética de *Lactobacillus plantarum* da silagem de alfafa pelo *fingerprint* BOX-PCR. Gel de agarose (1,6 %) mostrando os produtos de PCR do BOX-PCR. Os elementos genômicos BOX foram amplificados usando o primer BOX A1R. As linhas estão identificadas com os isolados e nas extremidades o marcador (DNA lader 1kb).

Dez padrões bem definidos de polimorfismo de bandas foram obtidos entre os isolados avaliados, estando os mesmos distribuídos em dez clados distintos (Figura 8). No clado 1 foram agrupados dois isolados obtidos no 7º e 56º dia de fermentação da silagem; clado 2 presença de isolados do 7º e 14º dia de fermentação; clado 3 presença de isolados do 3º, 7º, 28º e 56º de fermentação; clado 4 presença de isolados da planta, do 1º, 3º e 14º dia de fermentação; clado 5 presença de isolado no 1º, 3º e 7º dia de fermentação; clado 6 presença de isolados no 3º, 7º, 14º e 56º dia de fermentação; clado 7 presença de isolados no 1º, 3º, 28º e 56º dia de fermentação. Em cada clado mencionado anteriormente consideramos a presença de clones de *L. plantarum* pelo fato de apresentarem uma porcentagem de similaridade igual ou maior a 90 %. Somente três isolados de *L. plantarum* (3.4; 7.4; 7.8) não apresentaram clones, onde observa-se uma porcentagem de similaridade bem inferior a 90 %.



**Figura 8.** Dendrograma de similaridade genética. O perfil BOX-PCR dos *Lactobacillus plantarum* foi comparado com o software BioNumerics 5.10.

### 3.8 Caracterização dos isolados

A maioria dos isolados identificados era homofermentativa e todos cresceram em pH 4,5 e 8,5 e nas concentrações de 4% e 6,5% de sal. Um pequeno número de isolados não apresentou crescimento a temperatura de 45°C e 15°C e em meio de cultivo com o pH ajustado para 3,5 e 4,0 (Tabela 6).

**Tabela 6.** Caracterização dos isolados de bactérias lácticas isoladas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.

Isolados	Temp. <sup>1</sup> (°C)		pH				% Sal		CO <sub>2</sub>
	15	45	3.5	4.0	4.5	8.5	4.0	6.5	
0.1 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo <sup>3</sup>
0.2 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero <sup>4</sup>
0.4 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
0.5 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
0.7 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
0.9 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
0.10 SE	+	+	-	+	+	+	+	+	Homo
0.2 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
0.4 E	+	+	+	-	+	+	+	+	Hetero
0.5 E	+	-	-	+	+	+	+	+	Hetero
0.7 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
0.8 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
0.10 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.1 SE	+	+	-	-	+	+	+	+	Hetero
1.3 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.4 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
1.5 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.7 SE	+	+	+	-	+	+	+	+	Hetero
1.9 SE	+	+	-	+	+	+	+	+	Homo
1.10 SE	+	+	-	+	+	+	+	+	Hetero

<sup>1</sup>Temp.=Temperatura; <sup>2</sup> - = Ausência de crescimento; + = Presença de crescimento; <sup>3</sup>Homo= homofermentativo; <sup>4</sup>Hetero= Heterofermentativo.

**Tabela 6.** Caracterização dos isolados de bactérias lácticas isoladas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação (cont.).

Isolados	Temp. <sup>1</sup> (°C)		pH				% Sal		CO <sub>2</sub>
	15	45	3.5	4.0	4.5	8.5	4.0	6.5	
1.11 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
1.12 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
1.13 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.15 SE	+	+	-	-	+	+	+	+	Hetero
1.3 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
1.4 E	+	+	-	+	+	+	+	+	Homo
1.5 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.7 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
1.8 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.9 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.11 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.12 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.13 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
1.14 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
3.1 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
3.2 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.3 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.4 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
3-5 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
3.6 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.7 SE	+	-	-	+	+	+	+	+	Homo
3.8 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.9 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Hetero
3.10 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
3.11 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Hetero
3.12 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Hetero

<sup>1</sup>Temp.=Temperatura; <sup>2</sup> - = Ausência de crescimento; + = Presença de crescimento; <sup>3</sup>Homo= homofermentativo; <sup>4</sup>Hetero= Heterofermentativo.

**Tabela 6.** Caracterização dos isolados de bactérias lácticas isoladas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação (cont.).

Isolados	Temp. <sup>1</sup> (°C)				pH		% Sal		CO <sub>2</sub>
	15	45	3.5	4.0	4.5	8.5	4.0	6.5	
3.13 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
3.14 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.15 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.1 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.2 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.3 E	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
3.4 E	+	-	-	+	+	+	+	+	Hetero
3.5 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.6 E	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
3.7 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.8 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.9 E	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
3.10 E	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
3.11 E	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
3.12 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
3.13 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.14 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.15 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.2 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Hetero
7.3 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.4 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
7.5 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.6 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
7.8 SE	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
7.9 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.10 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo

<sup>1</sup>Temp.=Temperatura; <sup>2</sup> - = Ausência de crescimento; + = Presença de crescimento; <sup>3</sup>Homo= homofermentativo; <sup>4</sup>Hetero= Heterofermentativo.

**Tabela 6.** Caracterização dos isolados de bactérias lácticas isoladas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação (cont.).

Isolados	Temp. <sup>1</sup> (°C)		pH				% Sal		CO <sub>2</sub>
	15	45	3.5	4.0	4.5	8.5	4.0	6.5	
7.1 E	+	+	-	-	+	+	+	+	Homo
7.2 E	+	+	-	+	+	+	+	+	Hetero
7.4 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.5 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.6 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.8 E	+	+	-	-	+	+	+	+	Homo
7.10 E	+	+	-	-	+	+	+	+	Homo
7.11 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.2 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
14.7 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.13 SE	+	+	-	+	+	+	+	+	Homo
14.14 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.15 SE	+	+	-	-	+	+	+	+	Hetero
14.16 SE	+	+	-	+	+	+	+	+	Homo
14.1 E	+	+	-	-	+	+	+	+	Homo
14.2 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.3 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.5 E	+	-	-	-	+	+	+	+	Homo
14.7 E	+	+	-	-	+	+	+	+	Homo
14.10 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.11 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.12 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.15 E	+	+	-	+	+	+	+	+	Homo
14.16 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.18 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.19 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.20 E	+	+	-	-	+	+	+	+	Homo

<sup>1</sup>Temp.=Temperatura; <sup>2</sup> - = Ausência de crescimento; + = Presença de crescimento; <sup>3</sup>Homo= homofermentativo; <sup>4</sup>Hetero= Heterofermentativo.

**Tabela 6.** Caracterização dos isolados de bactérias lácticas isoladas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação (cont.).

Isolados	Temp. <sup>1</sup> (°C)		pH				% Sal		CO <sub>2</sub>
	15	45	3.5	4.0	4.5	8.5	4.0	6.5	
28.1 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.5 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.6 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.7 SE	+	+	-	-	+	+	+	+	Homo
28.8 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.9 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.12 SE	+	+	-	-	+	+	+	+	Homo
28.14 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.17 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
28.1 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
28.2 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
28.3 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.4 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
28.5 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.6 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.7 E	+	+	-	-	+	+	+	+	Homo
28.8 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.9 E	+	+	-	+	+	+	+	+	Homo
28.11 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.12 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.14 E	+	+	-	+	+	+	+	+	Hetero
28.15 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
28.16 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.19 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.1 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
56.5 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.6 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo

<sup>1</sup>Temp.=Temperatura; <sup>2</sup> - = Ausência de crescimento; + = Presença de crescimento; <sup>3</sup>Homo= homofermentativo; <sup>4</sup>Hetero= Heterofermentativo.



**Tabela 6.** Caracterização dos isolados de bactérias lácticas isoladas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação (cont.).

Isolados	Temp. <sup>1</sup> (°C)		pH				% Sal		CO <sub>2</sub>
	15	45	3.5	4.0	4.5	8.5	4.0	6.5	
56.11 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.12 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.13 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.16 SE	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.3 E	+	+	-	+	+	+	+	+	Homo
56.4 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.7 E	-	+	-	-	+	+	+	-	Homo
56.10 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.11 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.13 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.14 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.15 E	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo

<sup>1</sup>Temp.=Temperatura; <sup>2</sup> - = Ausência de crescimento; + = Presença de crescimento; <sup>3</sup>Homo= homofermentativo; <sup>4</sup>Hetero= Heterofermentativo.

Todos os isolados apresentaram atividade antagonista contra pelo menos um dos micro-organismos indicadores utilizados no teste antimicrobiano (Tabela 7). No entanto, os isolados 0,2E; 0,4E; 0,7E; 1,5SE não atuaram contra *Listeria monocytogenes* 19117, apenas o isolado 56,13SE não apresentou atividade antagonista contra *Listeria monocytogenes* 7644 e os isolados 0,7SE; 1,1SE; 1,3SE; 1,15SE não atuaram contra *Escherichia. coli*.

**Tabela 7.** Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.

Isolados	<i>L. monocytogenes</i> 19117	<i>L. monocytogenes</i> 7644	<i>E. coli</i>
	Raio de inibição		
0.1 SE	++	++	++
0.2 SE	++	++	++
0.4 SE	++	++	++
0.5 SE	++	++	++
0.7 SE	++	++	-
0.9 SE	+++	++	+
0.10 SE	+++	++	++
0.2 E	-	+	++
0.4 E	-	++	++
0.5 E	+++	++	+
0.7 E	-	+	++
0.8 E	++	++	+
0.10 E	++	++	++
1.1 SE	+++	+++	-
1.3 SE	+	+++	-
1.4 SE	++	++	++
1.5 SE	-	++	++
1.7 SE	+++	++	++
1.9 SE	++	++	++
1.10 SE	+	+	+

<sup>1</sup>*L. monocytogenes* 19117, *L. monocytogenes* 7644, *E. coli* = Micro-organismos indicadores do teste antimicrobiano.

<sup>2</sup>Raio de inibição (mm): - (ausência de halo de inibição), + (> 4 e ≤ 15), ++ (> 15 e ≤ 30), +++ (>30).

**Tabela 7.** Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação (cont.).

Isolados	<i>L. monocytogenes</i> 19117	<i>L. monocytogenes</i> 7644	<i>E. coli</i>
	Raio de inibição		
1.11 SE	++	++	++
1.12 SE	++	++	++
1.13 SE	++	++	++
1.15 SE	+	+	-
1.3 E	++	++	++
1.4 E	++	++	++
1.5 E	+++	++	++
1.7 E	++	++	++
1.8 E	+	+	+
1.9 E	+++	++	++
1.11 E	+	++	++
1.12 E	++	+	+
1.13 E	++	++	++
1.14 E	++	++	++
3.1 SE	++	++	++
3.2 SE	++	+	++
3.3 SE	++	++	++
3.4 SE	++	+	++
3-5 SE	++	++	++
3.6 SE	++	+++	+
3.7 SE	++	++	++

<sup>1</sup>*L. monocytogenes* 19117, *L. monocytogenes* 7644, *E. coli* = Micro-organismos indicadores do teste antimicrobiano.

<sup>2</sup>Raio de inibição (mm): - (ausência de halo de inibição), + (> 4 e ≤ 15), ++ (> 15 e ≤ 30), +++ (>30).

**Tabela 7.** Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação (cont.).

Isolados	<i>L. monocytogenes</i> 19117	<i>L. monocytogenes</i> 7644	<i>E. coli</i>
	Raio de inibição		
3.8 SE	++	++	++
3.9 SE	++	++	++
3.10 SE	++	++	++
3.11 SE	+	+	+
3.12 SE	++	+	+
3.13 SE	++	++	++
3.14 SE	++	++	++
3.15 SE	++	++	++
3.1 E	++	+	++
3.2 E	++	++	++
3.3 E	++	++	++
3.4 E	++	++	++
3.5 E	++	++	++
3.6 E	++	++	++
3.7 E	++	++	++
3.8 E	++	++	++
3.9 E	++	+	+
3.10 E	++	+	++
3.11 E	++	++	++
3.12 E	++	++	++

<sup>1</sup>*L. monocytogenes* 19117, *L. monocytogenes* 7644, *E. coli* = Micro-organismos indicadores do teste antimicrobiano.

<sup>2</sup>Raio de inibição (mm): - (ausência de halo de inibição), + (> 4 e ≤ 15), ++ (> 15 e ≤ 30), +++ (>30).

**Tabela 7.** Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação (cont.).

Isolados	<i>L. monocytogenes</i> 19117	<i>L. monocytogenes</i> 7644	<i>E. coli</i>
	Raio de inibição		
3.13 E	+++	+	++
3.14 E	++	++	++
3.15 E	++	++	++
7.2 SE	++	++	++
7.3 SE	++	+	++
7.4 SE	++	++	++
7.5 SE	++	++	++
7.6 SE	+	++	++
7.8 SE	++	++	+
7.9 SE	++	++	++
7.10 SE	++	++	++
7.1 E	++	+	++
7.2 E	++	++	++
7.4 E	+	++	++
7.5 E	++	++	++
7.6 E	++	++	++
7.8 E	++	+	++
7.10 E	++	++	++
7.11 E	++	++	++
14.2 SE	+	+	++

<sup>1</sup>*L. monocytogenes* 19117, *L. monocytogenes* 7644, *E. coli* = Micro-organismos indicadores do teste antimicrobiano.

<sup>2</sup>Raio de inibição (mm): - (ausência de halo de inibição), + (> 4 e ≤ 15), ++ (> 15 e ≤ 30), +++ (>30).

**Tabela 7.** Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação (cont.).

Isolados	Raio de inibição		
	<i>L. monocytogenes</i> 19117	<i>L. monocytogenes</i> 7644	<i>E. coli</i>
14.7 SE	++	++	++
14.13 SE	++	+	+++
14.14 SE	++	++	++
14.15 SE	++	++	++
14.16 SE	++	++	++
14.1 E	++	+	++
14.2 E	++	++	+++
14.3 E	++	++	++
14.5 E	+++	+++	++
14.7 E	++	++	++
1410 E	++	+	++
14.11 E	++	++	++
14.12 E	++	+	+
14.15 E	++	+	++
14.16 E	++	++	++
14.18 E	+++	++	++
14.19 E	++	++	+++
14.20 E	++	++	++
28.1 SE	++	++	++
28.5 SE	++	++	++
28.6 SE	++	++	+

<sup>1</sup>*L. monocytogenes* 19117, *L. monocytogenes* 7644, *E. coli* = Micro-organismos indicadores do teste antimicrobiano.

<sup>2</sup>Raio de inibição (mm): - (ausência de halo de inibição), + (> 4 e ≤ 15), ++ (> 15 e ≤ 30), +++ (>30).

**Tabela 7.** Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação (cont.).

Isolados	<i>L. monocytogenes</i> 19117	<i>L. monocytogenes</i> 7644	<i>E. coli</i>
	Raio de inibição		
28.7 SE	+++	+	++
28.8 SE	++	++	++
28.9 SE	++	++	++
28.12 SE	++	++	++
28.14 SE	++	++	++
28.17 SE	++	+	++
28.1 E	++	++	++
28.2 E	+	+	+
28.3 E	++	++	++
28.4 E	++	++	++
28.5 E	++	++	++
28.6 E	++	++	++
28.7 E	++	++	++
28.8 E	++	+++	++
28.9 E	++	++	++
28.11 E	+++	++	+++
28.12 E	++	+	+
28.14 E	++	++	++
28.15 E	+++	+++	++
28.16 E	++	++	++

<sup>1</sup>*L. monocytogenes* 19117, *L. monocytogenes* 7644, *E. coli* = Micro-organismos indicadores do teste antimicrobiano.

<sup>2</sup>Raio de inibição (mm): - (ausência de halo de inibição), + (> 4 e ≤ 15), ++ (> 15 e ≤ 30), +++ (>30).

**Tabela 7.** Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação (cont.).

Isolados	<i>L. monocytogenes</i> 19117	<i>L. monocytogenes</i> 7644	<i>E. coli</i>
	Raio de inibição		
28.19 E	++	++	++
56.1 SE	++	++	++
56.5 SE	+	++	++
56.6 SE	++	++	++
56.11 SE	++	++	++
56.12 SE	+	+	+
56.13 SE	+	-	++
56.16 SE	++	++	++
56.3 E	++	+	+
56.4 E	++	++	+
56.7 E	++	++	+
56.10 E	++	++	++
56.11 E	++	++	+
56.13 E	++	++	++
56.14 E	++	++	++
56.15 E	++	++	++

<sup>1</sup>*L. monocytogenes* 19117, *L. monocytogenes* 7644, *E. coli* = Micro-organismos indicadores do teste antimicrobiano.

<sup>2</sup>Raio de inibição (mm): - (ausência de halo de inibição), + (> 4 e ≤ 15), ++ (> 15 e ≤ 30), +++ (>30).



## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 *Composição química e populações microbianas antes da ensilagem*

O emurchecimento da alfafa antes da ensilagem incrementou o teor matéria seca de 133,9 g/kg MS para 233,4 g/kg MS. Esse incremento é baixo, se considerarmos que a nossa meta era atingir valores de 300-350 g/kg MS, que segundo McDonald et al. (1991), seria o mínimo adequado para proporcionar fermentação de qualidade e reduzir as perdas por efluente. Isto é atribuído as condições climáticas de alta nebulosidade predominantes cerca de 2h após o corte, com riscos de chuva. De acordo com Muck et al. (2003) o emurchecimento é mais comum nos Estados Unidos e parte da Europa onde a forragem pode ser emurchecida por 24 a 48h com pouco risco de danos por chuva.

McDonald et al. (1973) verificaram a importância dos carboidratos solúveis em água na ensilagem devido sua correlação alta e positiva com os teores de ácido lático das silagens. No entanto, no presente estudo, o emurchecimento proporcionou a redução de aproximadamente 7% na concentração destes (25,8 g/kg MS), valor abaixo dos 60-80 g/kg MS, considerado por Woolford (1972) como concentração mínima capaz de promover intensa fermentação láctica. Rangrab et al. (2000) também verificaram a redução no teor de carboidratos solúveis em água com o emurchecimento. Isto ocorreu possivelmente devido ao maior tempo decorrente entre o corte e a condição de anaerobiose após a ensilagem, tornando os carboidratos solúveis vulneráveis a serem consumidos pelos micro-organismos autóctones.

O emurchecimento proporcionou redução de aproximadamente 31% na capacidade tampão (428,5 x 295,9 mEq/kg MS) da forrageira, devido a redução dos íons inorgânicos presentes na planta (Smith, 1962), fato também verificado por Muck e Walgenbach (1985). A capacidade tampão da forragem não emurchecida, de 428,50 mEq/kg MS, é próxima aqueles valores de 433,5 e 439,7 mEq/kg MS encontrados por Rangrab et al. (2000) e Monteiro et al. (1998), respectivamente.

A elevada capacidade tampão das leguminosas é promovida por aminoácidos residuais e presença de cátions que neutralizam os ácidos orgânicos produzidos pela fermentação, dificultando a redução do pH (McDonald et al., 1991). Outro fator responsável pela alta capacidade tampão é o elevado teor de proteína que, devido à liberação de compostos nitrogenados pela decomposição proteica, neutralizam parte do ácido lático formado e,

consequentemente, elevam o pH (Pereira et al., 2008). A redução no teor de PB da forrageira emurchedida é atribuída à perda de folhas e a proteólise que ocorre comumente durante o processo de emurchedimento (Muck, 1988).

O emurchedimento aumentou a população de BAL da forragem de 5,28 log UFC/g para 6,88 log UFC/g. O crescimento microbiano pós corte é afetado tanto pelo ambiente como fatores de manejo (Muck, 1989). Esse autor reportou que o emurchedimento da alfafa abaixo de 15°C não foi propício ao crescimento de BAL. No entanto, em seu estudo foi verificado um incremento mais rápido na população de BAL nas primeiras 48h de emurchedimento. Tyrolova et al. (2012) também observaram maiores contagens de BAL na alfafa emurchedida. Segundo Pitt et al. (1985) o aumento da taxa de crescimento da população de BAL com o emurchedimento é decorrente da combinação de menor teor de umidade e aumento nos níveis de carboidratos solúveis em água da forrageira. No entanto, no nosso estudo foi observado menor conteúdo de carboidratos solúveis em água na forrageira emurchedida.

#### 4.2 *Populações microbianas e perfil fermentativo*

A ausência de efeito do inoculante sobre a população de BAL está associada a fatores que limitam seu crescimento como: escassez de nutriente ou acúmulo de produtos de excreção do organismo, resultando em condições insuficientes para causar rápido decréscimo do pH e superar a população epifítica (Muck, 1988).

As enterobactérias são indesejáveis nas silagens, pois são capazes de competir com as BAL por carboidratos disponíveis, principalmente durante a fase inicial de fermentação. Este grupo bacteriano fermenta açúcares formando lactato, acetato, succinato e gás carbônico, além de formarem amônia a partir de estruturas proteicas, aumentando as perdas de matéria seca e energia da silagem (McDonald et al., 1991).

Pesquisas com silagens de diferentes plantas forrageiras têm demonstrado que as enterobactérias sofrem grandes reduções até o décimo dia de fermentação, podendo ou não desaparecer por completo até o final do período de conservação (Meeske et al., 1999). No nosso estudo, a redução brusca na contagem das enterobactérias observada no 3º dia após a ensilagem ocorreu possivelmente pelos maiores teores de ácido láctico e menores valores de pH, evidenciando a dominância das BAL sobre esse grupo de micro-organismo. No entanto, a detecção deste grupo bacteriano em todas os dias de fermentação pode ter ocorrido devido aos

elevados valores de pH das silagens, pois estes micro-organismos se desenvolvem em faixas de pH mais elevadas (McDonald et al., 1991).

As leveduras da silagem são capazes de produzir ácido lático, ácidos graxos voláteis e álcool. Embora Woolford (1984) tenha demonstrado que as leveduras sejam capazes de produzir ácido lático e acético pela fermentação dos açúcares, sua presença na silagem não é considerada desejável, pois além de competirem com as BAL por substrato, também estão associadas com a deterioração aeróbia. A presença de mofo e leveduras ao longo do período de fermentação em todas as silagens pode indicar que a quantidade de ácidos orgânicos produzidos não foram suficientes para inibir a produção destes micro-organismos, conforme sugerem Weinberg et al. (1993).

A qualidade das silagens pode ser avaliada pelos produtos finais de fermentação, como ácidos orgânicos, pH e N-NH<sub>3</sub>. O comportamento cúbico do pH nas silagens emurhecidas ou não em função de períodos de fermentação não era esperado. No entanto, este reflete o comportamento observado para o ácido lático. Foi observada uma redução no pH nos três primeiros dias de fermentação e aumento deste até os 28 dias, quando decresceu novamente. Isto reflete a baixa produção de ácido lático, que não foi suficiente para estabilização da massa ensilada, aliada a uma alta fermentação acética, conforme observado no presente trabalho. A ocorrência do rápido declínio de pH, seguido de reversão do processo fermentativo possivelmente pela falta de substrato disponível para atingir a estabilização da fermentação, também foi observada por Rangrab et al. (2000), em estudos com silagens de alfafa.

Embora ambos os valores finais de pH das silagens não emurhecida (5,10) e emurhecida (4,96) esteja acima de 4,5, estabelecido por Mahana e Chase (2003) para silagens de leguminosa, outros trabalhos também reportaram pH em torno de 5 para silagem de alfafa (Denoncourt et al., 2006, Rossi e Dellaglio 2007, McGarvey et al., 2013).

O aumento linear na concentração de N-NH<sub>3</sub> tanto nas silagens emurhecidas como não emurhecidas é resultado de intensa proteólise durante a fermentação quando não ocorrem condições ácidas suficientes, para que micro-organismos indesejáveis como enterobactérias e clostrídeos possam ser inibidos. Entretanto o emurhecimento resultou em silagens com concentração de N-NH<sub>3</sub> 134,7 g/kg NT, inferior as 150 g/kg NT consideradas por Mahanna e Chase (2003) como aceitáveis para uma boa fermentação em silagens de leguminosas.

Apesar de todos os ácidos formados na fermentação contribuírem para redução do pH da silagem, o ácido lático possui fundamental papel nesse processo, por apresentar maior constante de dissociação em relação aos demais (Moisio e Heikonen, 1994). O comportamento cúbico do

ácido láctico, em função do período de fermentação, repete aquele observado para o pH, conforme já destacado. O decréscimo na produção do ácido láctico a partir do sétimo dia de fermentação pode ser consequência da diminuição da atividade das BAL e da dominância de enterobactérias e leveduras ao longo do período de fermentação, evidenciados pelo aumento nos valores de pH e na produção de ácido acético e N-NH<sub>3</sub> das silagens.

Os teores de ácido acético das silagens não emurhecida (74,9 g/kg MS) e emurhecida (49,8 g/kg MS), no último dia de fermentação, são superiores aos 20 g/kg MS estabelecidos por Mahanna (1993) como adequado em silagens bem fermentadas. No entanto, os valores encontrados nas silagens emurhecidas foram superiores as concentrações de 30 a 40 g/kg MS encontrada por Contreras-Govea et al. (2011) para silagens de alfafa após 60 dias de fermentação.

Os maiores teores de ácido acético nas silagens não emurhecidas provavelmente estão associados a menor taxa de declínio do pH, que pode ser resultado da menor eficiência das BAL em dominar o processo fermentativo, favorecendo outros micro-organismos produtores de ácido acético.

A menor concentração de ácido propiônico nas silagens emurhecidas justifica-se pelo maior controle das fermentações secundárias que resultam na formação de outros ácidos orgânicos. Os valores de ácido propiônico, de 5,4 e 3,2 g/kg MS para silagens não emurhecidas e emurhecidas respectivamente, no final do período de fermentação, se encontram dentro da faixa aceitável de produção deste ácido que, segundo Mahanna (1993), deve ser de 1 a 10 g/kg MS para silagem de boa qualidade.

A ausência de efeito de inoculante bacteriano sobre a maioria das variáveis do perfil fermentativo pode ser explicada por diversos fatores, como por exemplo: teor de carboidratos solúveis e de matéria seca das plantas ensiladas, população epifítica e cepas de bactérias presente no inoculante (Muck, 1993; Mahanna, 1993).

O emurhecimento favoreceu a produção de silagens com melhor qualidade fermentativa e menor incidência de fermentações secundárias indesejáveis o que pode ser atribuído à diminuição da atividade de água ou elevação da pressão osmótica (McDonald et al., 1991), evidenciados pelos menores valores de pH e marcante diferença na concentração de N-NH<sub>3</sub> e melhor relação entre os ácidos láctico e acético.

#### 4.3 *Composição química após 56 dias de fermentação*

Ao longo do período de fermentação, a redução nos teores de PB das silagens pode ter ocorrido devido à proteólise realizada por enterobactérias e clostrídeos (Muck, 1996). Embora os teores de PB das silagens emurhecidas tenham sido inferiores (154 g/kg MS) aos das silagens não emurhecidas (160,6 g/kg MS), observou-se proteólise mais intensa nas silagens não emurhecidas, evidenciando o ambiente favorável para o desenvolvimento de micro-organismos proteolíticos.

Maiores teores de NIDA foram encontrados nas silagens não emurhecidas (81,60 g/kg N), no entanto, todas as silagens apresentaram valores abaixo do nível crítico de 200 g/kg N proposto por Van Soest e Mason (1991), caracterizando boa preservação, haja vista que, o aumento do nitrogênio ligado à fração em detergente ácido é indesejável no aspecto nutricional, pois se torna indisponível aos micro-organismos do rúmen (Van Soest, 1994). O menor valor dos constituintes fibrosos nas silagens emurhecidas se deve à maior hidrólise desta fração nessas silagens.

#### 4.4 Identificação, sucessão de bactérias lácticas e filogenia.

Embora tenham ocorrido variações no aparecimento das espécies ao longo dos períodos de fermentação, a diversidade microbiana entre as plantas e silagens não emurhecidas e emurhecidas apresentou pouca variação. Segundo Hartmann e Windmer (2006), as alterações significativas nas populações bacterianas não ocorrem necessariamente no índice de diversidade, mas podem ocorrer mudanças no aparecimento de alguns grupos taxonômicos que são compensados pelas alterações em outros grupos.

O gênero *Lactobacillus* é um dos mais importantes gêneros de BAL e inclui mais de 174 espécies (DSMZ, 2008) e são encontrados numa grande variedade de habitats e sendo empregados na fabricação de alimentos fermentados, além de serem utilizados como probióticos em seres humanos e animais (Ouwehand et al., 2002).

O *L. plantarum* é uma das bactérias mais utilizadas como inoculante em silagens, devido seu vigoroso crescimento, tolerância ao meio ácido e potencial elevado de produção de ácido láctico, resultando em maior redução do pH do material ensilado. Sua predominância também foi descrita em outros estudos de identificação de espécies de bactérias lácticas da alfafa (Stevenson et al., 2006; Wang et al., 2006), azevém (Cai et al., 1999), palha de milho e arroz (Ennahar et al., 2003) e silagem mista de *Phleum pratense* e *Dactylis glomerata* L. (Tohno et al., 2012).

Todavia, a predominância de uma determinada espécie de BAL dentre as demais bactérias do mesmo grupo não significa que esta espécie apresentará dominância sobre os demais grupos de microrganismos presentes no silo. Várias características fisiológicas e metabólicas influenciam na dominância de uma determinada espécie, com a capacidade de utilização do substrato disponível, comportamento de decréscimo do pH, produção de ácidos, velocidade de crescimento, produção de bacteriocinas, dentre outras. A predominância de outros microrganismos em relação ao *L. plantarum* nas silagens é evidenciado pelos maiores valores de pH, as baixas concentrações de ácido lático e aos altos teores de ácido acético das silagens.

Várias das espécies identificadas apresentam interesse comercial como o *L. casei* que são utilizados principalmente como probióticos e flavorizantes de queijo (Mayra-Makinen e Bigret, 1998). Sua ampla aplicação comercial reflete a sua notável capacidade de adaptação ecológica em diversos habitats.

As espécies *L. pentosus* e *L. paraplantarum* são genotipicamente relacionadas e apresentam muitas semelhanças fenotípicas. São utilizados como conservadores de alimentos, probióticos e algumas estirpes apresentam ação antimicrobiana através da produção de bacteriocinas.

O *L. brevis* é uma BAL heterofermentativa utilizada como aditivo biológico para melhorar o processo de ensilagem. Danner et al. (2003) demonstraram em seu estudo que esse micro-organismo tem potencial para melhorar a produção de silagem através do ácido acético produzido, que resulta em estabilidade aeróbia prolongada.

A presença da BAL *L. curvatus* foi relatada em várias plantas e silagens (Masuko et al 1992; Magnusson Schnurer, 2001; Schachtsiek et al., 2004; Tanaka et al., 2009), e apresentou alta eficácia quando inoculadas em silagens de *Lolium multiflorum* (Tanaka et al, 2000).

A primeira identificação do *L. acidipiscis*, originalmente isolado de peixe fermentado (Tanasupawat et al., 2000), e *Enterococcus gallinarum*, originalmente isolado do intestino da galinha (Bridge e Sneath, 1982), a partir de culturas forrageiras, foi relatado por Tohno et al. (2012) em estudo com silagens mistas de *Phleum pratense* e *Dactylis glomerata* L., evidenciando a variedade de nichos presentes no ambiente fermentativo.

Outras BAL, tais como *Leuconostoc*, *Pediococcus* e cepas *Weissella*, foram isolados em baixas frequências em culturas forrageiras e suas silagens (Lin et al, 1992b; Cai et al. 1998). O isolamento de *Weissella hellenica* evidencia que os habitats naturais desta espécie não são apenas carnes e produtos derivados (Collins et al., 1993), mas também são encontradas em culturas

forrageiras. No entanto, segundo Cai et al. (1998), geralmente a presença de bactérias heterofermentativas do gênero *Weissella* nas silagens pode resultar em perdas durante a fermentação.

Os isolados selecionados para reconstrução da árvore filogenética apresentaram agrupamento, com valores de bootstrap entre 93 e 100, com sequências de nucleotídeos de bactérias depositadas no GenBank. Isto indica que existe uma relação filogenética muito forte entre sequências de isolados obtidos neste estudo com sequências de isolados pertencentes ao banco de dados do GenBank e além disso, reforça a identidade dos isolados obtida pelo sequenciamento parcial do gene 16S rDNA.

## 5 CONCLUSÃO

A adição de inoculante bacteriano em alfafa submetida ou não ao emurchecimento, não favoreceu o processo fermentativo devido o emurchecimento não ter elevado o teor de matéria seca para um nível suficiente para promover adequada fermentação na silagem de alfafa em condições tropicais.

Existe grande diversidade nas espécies de bactérias lácticas em alfafa e em suas silagens. O *Lactobacillus plantarum* é a espécie predominante e apresenta comportamento distinto ao longo dos períodos de fermentação nas silagens não emurchecidas e emurchecidas. Esses isolados serão avaliados em estudos futuros para verificar o potencial dos mesmos como inoculantes para silagem de alfafa.



## 6 REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Molec. Biol.** 215, p. 403-410, 1990.
- Association of Official Analytical Chemists. In: Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Methods Inc., Arlington, VA, USA770, 15th ed, 1990.
- BERGEY'S MANUAL FOR SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Baltimore, 4 ed., 1986.
- BRIDGE P.D.; SNEATH P.H.A. Streptococcus-gallinarum Sp-Nov and streptococcus-oralis Sp-Nov. **Intern. J Systematic Bacteriol.** 32, 410-415, 1982.
- CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M.; KUMAI, S. Effects of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. **J Dairy Sci** 82, 520-526n, 1999.
- CARVALHO, L. A.; VILELA, D. Produção artificial de feno de alfafa (*Medicago sativa* L.) e seu uso na alimentação animal. In: CARVALHO, L.A.; VILELA, D. (Ed.). **Cultura da alfafa: estabelecimento, fenação, custo de produção e construção de um secador estático.** Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL, p. 13-20, 1994.
- COLLINS, M.D.; SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; WALLBANKS, S. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **J. Appl. Microbiol.** 75 (6): 595-603, 1993.
- CONTRERAS-GOVEA, F. E.; MUCK, R. E.; MERTENS, D. R.; WEIMER, P. J.; Microbial inoculant effects on silage and in vitro ruminal fermentation, and microbial biomass estimation for alfalfa, bmr corn, and corn silages. *Animal Feed Science and Technology.* v. 163, p. 2 - 10, 2011.
- DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E. et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Appl. and Environ. Microbiol.**, v.69, n.1, p.562-567, 2003.

- DENONCOURT, P.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Bacteriological and chemical changes occurring in bunkerstored silage covered with biodegradable coating. **J. Appl. Microbiol.** 103, 261–270, 2006.
- DERIAZ, R. E. Routine analysis of carbohydrate and lignin in herbage. **J. Sci. Food Agric.** 12:150-160, 1961.
- DROSINOS, E. H.; PARAMITHIOTIS, S.; KOLOVOS, G.; TSIKOURAS, I.; METAXOPOULOS, I. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. **Food Microbiol.** v. 24, p. 260 – 270, 2007.
- FENTON, M. An investigation into the sources of lactic acid bacteria in grass silage. **J. Appl. Bacteriol.** 62:181, 1987.
- FILYA, L., R.E. MUCK, AND F.E. Contreras-Gouvea. Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value. **J. Dairy Sci.** 90:5108-5114, 2007.
- HARTMANN, M. AND WINDMER, F. Community structure analysis are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. **Appl Environ Microbiol.** 72, 7804–7812, 2006.
- 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. **Appl. and Environ. Microbiol.** v.63, p. 3233-3241, 1997.
- JONES, B.A.; SATTER, L.D.; MUCK, R.E. Influence of bacterial inoculant and substrate addition to lucerne ensiled at different dry matter contents. **Grass and Forage Sci.**, 47:19-27, 1992.
- KUNG JR., L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) **Silage Sci. Technol.** Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA. p.305-360, 2003.

- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Sci. and Technol.** v.57, p.347-358, 1996.
- 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. **J. Appl. Bacteriol.**, 73, 375307, 1992b.
- LIN, C.; BOLSEN, K.K.; BRENT B.E.; HART, R. A.; DICKERSON J. T. Epiphytic Microflora on Alfalfa and Whole-Plant Corn **J. Dairy Sci.** 75:2484-2493, 1992a
- LIU, Q.; CHEN, M.; ZHANG, J.; SHI, S.; CAI, Y. Characteristics of isolated lactic acid bacteria and their effectiveness to improve stylo (*Stylosanthes guianensis* Sw.) silage quality at various temperatures. **Animal Sci J.** v. 83, p. 128 – 135, 2012.
- MAGNUSSON J. and SCHNURER J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. **Appl. and Environ. Microbiol.** 67, 1–5, 2001.
- MAHANNA, B.; CHASE, L.E. Practical application and solution to silage problems. In: SILAGE SCIENCE AND TECHNOLOGY. Madison. Proceedings... Madison: ASCSSA-SSSA, Agronomy 42, p. 31-93, 2003.
- MAHANNA, WC. Silage fermentation and additive use in north america. In: Silage production from seed to animal, **Proceedings...** New York, NRAES, p. 85-95, 1993.
- MAYRA-MAKINEN, A. and BIGRET, M. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria – Microbiology and Functional Aspects*, 2nd edn, p. 73–102. Edited by S. Salminen & A. V. Wright. New York: Marcel Dekker 1998.
- MASUKO T, OKADA S, UCHIYAMA T, AWAYA K. Effects of inoculation with lactic acid bacterial culture at ensiling on the fermentative quality and flora of lactic acid bacteria of grass silage. **Animal Sci. and Technol.** 63, 1182–1187, 1992.
- MCALLISTER, T.A.; FENIUK, R.; MIR, Z. et al. Inoculants for alfalfa silage: effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. **Livestock and Production Sci**, v.53, n.2, p.171-181, 1998.

- MCDONALD, P. The Ensilage Process. In Chemistry and Biochemistry of Herbage. Volume 3. Eds G.W. Butler, G.W. & Bailey, R.W., Academic Press, New York, USA. p. 33, 1973
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON; S. J. E. **Biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcombe Publication. p. 340, 1991.
- MCGARVEY, J. A.; FRANCO, R. B.; PALUMBO, J. D.; HNASKO, R.; STANKER, L.; MITLOEHNER, F. M.; Bacterial population dynamics during the ensiling of *Medicago sativa* (alfalfa) and subsequent exposure to air. **J. Appl. Microbiol.** v. 114, p. 1661 – 1670, 2013.
- MEESKE, R.; BASSON, H.M.; CRUYWAGEN, C.W. The effect of a lactic acid bacterial inoculant with enzymes on the fermentation dynamics, intake and digestibility of *Digitaria eriantha* silage. **Animal Feed Sci. and Technol.**, 81 (3/4):237-248. 1999.
- MELVIN, J.F. Variations in the carbohydrate content of lucerne and the effect on ensilage. **Austr. J. Agric. Res.**, 16:951-959, 1965.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **J. AOAC International**. v.85, n.6, p.1217-1240, 2002.
- MONTEIRO, A. L. G; COSTA, C.; ARRIGONI, M. B. Avaliação do Potencial para Ensilagem de Cultivares de Alfafa (*Medicago sativa* L.). **R. Bras. Zootec.**, v.27, n.5, p.1064-1068, 1998
- MUCK, R. E. Factors influencing silage quality and their implications for management. **J. Dairy Sci.** v.71, p.2992-3002, 1988.
- MUCK, R. E. Initial bacterial numbers on lucerne prior to ensiling. **Grass Forage Sci.** 44:19 , 1989.
- MUCK, R. E. The role of silage additives in making high quality silage. **In: SILAGE PRODUCTION FROM SEED TO ANIMAL**. 1993. New York. Proceedings..., New York:NRAES, n.67, p.106-116, 1993.
- MUCK, R. Inoculant of silage and its effects on silage quality. : Informational conference with dairy and forage industries. **Proceedings**...US Dairy Forage Research. p. 43 -52, 1996.

- MUCK, R.E.;WALGENBACH, R. Variation in alfafa buffering capacity. **American Society of Agricultural Engineers**-Paper N° 85-1535. St. Joseph, MI. USA, 1985.
- MOISIO, T., HEIKONEN, M. Lactic acid fermentation in silage preserved with formic acid. *Animal Feed Science and Technology*, v.47, n.1, p.107-124, 1994.
- OUWEHAND A; SALMINEN S; ISOLAURI E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek.* ;82:279–289, 2002.
- PEREIRA, O. G.; OLIVEIRA, A.S.; RIBEIRO, G. K.; RIGUEIA, J.P.S.; MELO FILHO, O.L.. SOUZA, W.F. Otimização de dietas à base de silagens de soja, In: II Simpósio Internacional de Produção de Gado de Corte, 2008, Viçosa. **Anais...**Viçosa, p.213, 2008
- PITT, R.E. A model of cellulase and amylase additives in silage. **J. Dairy Sci.**, 73(7):1788-1799, 1990.
- PLAYNE, M. J. AND P. MCDONALD. The buffering constituents of herbage and of silage. **J. Sci. Food Agric.** 17:264–268, 1966.
- RANGRAB, L. H.; MÜHLBACH, P. R. F.; BERTO, J. L. Silagem de alfafa colhida no início do florescimento e submetida ao emurchecimento e à ação de aditivos biológicos. **R. Bras. de Zootec.** v. 29 (2), p. 349-356, 2000.
- ROSSI, F. AND DELLAGLIO, F. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. **J Appl Microbiol** 103, 1707–1715, 2007.
- RUSER, B. **Erfassung und Identifizierung des epiphytischen Milchsäure-bakterienbesatzes auf Gras und Mais in Abhängigkeit von Standort, Sorte, Entwicklungsstadium sowie Temperatur- und Klimaeinflüssen.** Ph.D. Diss., Inst. Grassl. Forage Res., Braunschweig, Germany, 1989.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molec. Biol. and Evolution** v.4, p. 406–425, 1987.
- SCHACHTSIEK M, HAMMES WP, HERTEL C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. **Appl. and Environ. Microbiol.** 70, 7078–7085, 2004.

- SIEGRIFIELD, V.R., H. RUCKEMANN AND G. STUMPF. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtsch Forsch.** 37:298-304, 1984.
- STEVENSON, D. M.; MUCK, R. E.; SHINNERS, K. J.; WEIMER, P. J. Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover. **Appl. Microbiol. & Biotechnol.** v. 71, p. 329 - 338, 2006.
- TAGG, J.R.; DAJANI A.S.; WANNAMAKER L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev.** v. 40, p. 722-756, 1976.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. Mega 6. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.0. **Molec. Biol. and Evolution.** v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TANASUPAWAT S.; SHIDA O.; OKADA S.; KOMAGATA K. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. **Intern. J. Systematic and Evolution. Microbiol** 50 (Pt 4), 1479–1485, 2000.
- TANAKA O, KOMATSU T, OSHIBE A, CAI Y, MIYAZAKI S, NAKANISHI TANAKA O, MORI K, OMOMO S. Effect of inoculation with *Lactobacillus curvatus* on ensiling. **Grassland Sci.** 46, 148–152, 2000.
- TANAKA O.; KOMATSU T.; OSHIBE A.; CAI Y.; MIYAZAKI S.; NAKANISHI K. Production of 3-hydroxypropionaldehyde in silage inoculated with *Lactobacillus coryniformis* plus glycerol. **Biosci., Biotechnol., and Biochem.** 73, 1494– 1499, 2009.
- TOHNO, M.; KOBAYASHI, H.; NOMURA, M; UEGAKI, R.; CAI Y. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from mixed pasture of timothy and orchardgrass, and its badly preserved silages. **Animal Sci. J.** 83, 318–330, 2012.
- TYROLOVA Y.; VYBORNA A.; LOUCKA R. The effects of wilting and additives on the number of lactic acid bacteria in alfalfa forage and silage. **Proceedings: XVI International Silage Conference Hämeenlinna, Finland, 2012.**

- VALADARES FILHO, S.C. **Digestibilidade aparente e locais de digestão da matéria seca, energia e carboidratos de feno de soja perene.** Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte. 88p, 1981.
- VAN SOEST, P.J.; MASON, V.C. The influence of Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. **Animal Feed Sci. and Technol.** v. 32, p. 45-53, 1991.
- VAN SOEST, P.J.; Nutricional ecology of the ruminant. 2.ed. Cornell University Press. p. 476, 1994.
- VILELA, D. Produção de leite em pastagens de alfafa. **Informe agropecuário.** v. 22, n. 211, p. 38-43, 2001.
- WANG, X.; HARUTA, S.; WANG, P.; ISHII, M.; IGARASHI, Y.; CUI, Z. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. **Microbiol. Ecol.** v. 57, p. 106 – 115, 2006.
- WEATHERBURN, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Anal. Chem.**, v.39, p.971-974, 1967.
- WEINBERG, Z. G.; G. ASHBELL; Y. Hen, and A. Azrieli. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. **J. Appl. Bacteriol.** 75:512–518, 1993.
- WEISE, F. The influence of initial plant microbial populations on the course of fermentation. Page 221 **in** Proc. 3rd General Mtg. Eur. Grassl. Fed., Inst. Grassl. Forage Res., Braunschweig, Germany, 1969.
- WOOLFORD, M. K. Some aspects of the microbiology and biochemistry of silage making. **Herb. Abstr.** , 42(2): 105-111 (Review article). 1972.
- WOOLFORD, M.K. The silage fermentation. New York, Marcel Dekker. p.23-132, 1984.