

# MICRORGANISMOS EPIFÍTICOS EM SILAGEM DE GRÃOS REIDRATADOS DE MILHO: CONTAGEM, CRESCIMENTO MICROBIANO E PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO

DENISE ELLEN ANDRADE SILVA<sup>1\*</sup>; MARCOS PAULO REIS SOUSA<sup>1</sup>; MARCUS VINICIUS SANTA BRÍGIDA CARDOSO<sup>2</sup>; YASMIM ALVARENGA SILVA<sup>2</sup>; CARLA LUIZA DA SILVA ÁVILA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Graduação em Zootecnia – UFLA; <sup>2</sup>Estudante de Pós-graduando em Zootecnia – UFLA; <sup>3</sup>Professora Adjunta – UFLA.

[denise.silva2@estudante.ufla.br](mailto:denise.silva2@estudante.ufla.br)\*

## RESUMO

Microrganismos epifíticos podem ser grandes potenciais na formação de novos inoculantes bacterianos. Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a contagem de microrganismos, crescimento, potencial de redução de pH e produtos da fermentação de isolados de bactérias do ácido láctico obtidos em silagem de grãos reidratados de milho em diferentes tempos de estocagem. Os tratamentos consistiram em silagem de grãos reidratados de milho armazenados por 1, 3, 5, 15, 30 e 60 dias. Os silos experimentais foram utilizados baldes de 5 L e compactados  $5,096 \pm 0,04$  kg de milho reidratado (densidade =  $943,66 \pm 8,67$  kg.m<sup>-3</sup>). Foram preparadas 4 repetições por tempo de estocagem (24 silos experimentais). Os valores de máximo, média e mínimo foram calculados utilizando o software Excel®. A contagem de bactérias do ácido láctico reduziu com o tempo de estocagem (de 1 para 60 dias), variando de 7,072 para 6,491 log UFC.g<sup>-1</sup> e de 7,211 para 6,395 log UFC.g<sup>-1</sup>, para os meios de cultura MRS Agar Padrão e MRS modificados, respectivamente. Maior crescimento foi observado em isolados obtidos em ambos os meios de cultura com 30 e 60 dias de estocagem. O ácido láctico foi o principal produto orgânico formado pelos isolados. Todos os isolados são promissores como possíveis microrganismos iniciadores da fermentação.

Palavras-chave: Ácido láctico; BAL; Estocagem; Grão ensilado; Identificação.

## INTRODUÇÃO

Silagem é um alimento produzido a partir da fermentação dos açúcares presentes na forragem no momento da colheita por microrganismos que conservam a massa em condições de baixo pH e ausência de oxigênio (anaerobiose) (PAHLOW et al., 2003). Uma das características relacionadas à planta refere-se à população de microrganismos presentes no momento da ensilagem e, dependendo do tipo de microrganismo, estes irão definir o tipo de fermentação, bem como os produtos finais formados pelo seu metabolismo (ROOKE; HATFIELD, 1984). Nesse cenário, as bactérias do ácido láctico (BAL) são os principais microrganismos responsáveis pelo processo (MUCK et al., 2018).

O desenvolvimento de novos produtos a partir de microrganismos epifíticos é pouco explorado na literatura. Além disso, geralmente as cepas utilizadas como inoculantes são oriundas de forragens diferentes daquelas onde o inoculante será aplicado. De modo geral, a seleção de microrganismos iniciadores é alvejada com o propósito de obter cepas capazes de

potencializar o padrão de fermentação e são oriundos do próprio alimento (e.g. silagem). A caracterização desses microrganismos é um passo importante para obter informações específicas de uma determinada cepa que pode auxiliar no melhor manuseio desses microrganismos. Com isso, objetivou-se avaliar a contagem de microrganismos, crescimento, potencial de redução de pH e produtos da fermentação de isolados de BAL obtidos em silagem de grãos reidratados de milho (SGRM) em diferentes tempos de estocagem.

## **METODOLOGIA**

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia na Universidade Federal de Lavras, Brasil (21°13'49" S, 44°58'10" W). O grão de milho foi obtido comercialmente e moído com peneira de crivo de 1 mm. O milho obtido apresentou um teor de umidade, em média, igual a 7%. Foi utilizada uma taxa de reidratação de 320 L.H<sub>2</sub>O ton<sup>-1</sup> de milho, até que o grão atingiu 33,9% de umidade.

Os tratamentos incluíram SGRM em seis tempos de estocagem: 1, 3, 5, 15, 30 e 60 dias. Como silos experimentais foram utilizados baldes de 5 L e compactados 5,096 ± 0,04 kg de milho reidratado (densidade = 943,66 ± 8,67 kg.m<sup>-3</sup>). Foram preparadas 4 repetições para cada tempo de estocagem (24 silos experimentais). A compactação foi realizada de forma manual onde os silos experimentais foram tampados e vedados com lona plástica sob a tampa, vedados com silicone e, posteriormente, pesados. Passados os referidos tempos de estocagem, os silos foram novamente pesados e abertos e retirada amostras para posterior análises.

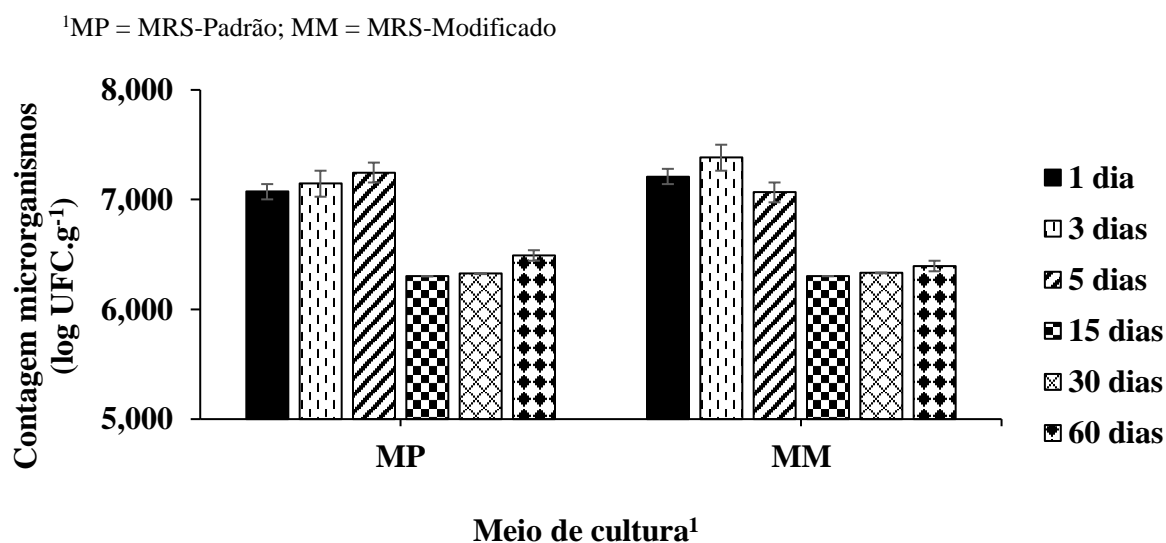
A contagem de microrganismos foi realizada utilizando a técnica de plaqueamento em superfície. Foram utilizados dois meios cultura: (MP) MRS Agar Padrão (de MAN, ROGOSA and SHARPE, Merck KGaA) e (MM) MRS modificado (glicose e peptona substituída por caseína (2,5 g.L<sup>-1</sup>) na composição), onde foram preparadas diluições em séries de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-7</sup> em duplicata. As placas permaneceram em estufa, a 37 °C, durante três dias. As colônias foram contadas com base nas suas características macromorfológicas.

A avaliação do crescimento em extrato foi realizada de acordo com Saarisalo et al., (2007). Para a avaliação do crescimento do inóculo e decréscimo do valor de pH, foram retiradas amostras imediatamente após a inoculação em extrato aquoso e após 24 horas de fermentação. O crescimento foi avaliado por turbidimetria em espectrofotômetro a 600 nm (Shimadzu model UV-2501; Shimadzu Corp., Tokyo, Japan), e o pH foi mensurado através da utilização de um potenciômetro digital (Digimed Analítica, modelo DM20®). A produção dos ácidos lático, acético, propiônico e butírico e dos álcoois 1,2-propanodiol e etanol durante a fermentação foi avaliado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os valores de máximo, média e mínimo foram calculados utilizando o software Excel®.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A contagem de BAL reduziu com o tempo de estocagem (de 1 para 60 dias), variando de 7,072 para 6,491 log UFC.g<sup>-1</sup> e de 7,211 para 6,395 log UFC.g<sup>-1</sup>, para os meios MP e MM, respectivamente. Uma redução significativa ocorreu de 5 para 15 dias de fermentação nas silagens (MP = de 7,247 para 6,302 log UFC.g<sup>-1</sup>; MM = de 7,066 para 6,303 log UFC.g<sup>-1</sup>). A maior contagem nos primeiros dias provavelmente está atrelada à maior concentração de substrato disponível para o metabolismo microbiano (CARVALHO et al, 2017). O crescimento de BAL em ambos os meios de cultura nos leva a pressupor que os isolados são capazes de degradar tanto a glicose quanto a caseína para o seu metabolismo nos meios de cultura padrão e modificado, respectivamente.

**Gráfico 1** – Contagem de microrganismos em meio de cultura MRS padrão (MP) e modificado (MM) em silagens de grãos reidratados de milho em diferentes tempos de estocagem.



Os resultados de pH e crescimento em extrato estão apresentados na Tabela 1. O valor de pH do extrato sem inoculação bacteriana foi de 6,56 (dato não apresentado na tabela). Os isolados obtidos a partir do meio MP mostraram maior e menor valor de pH com 60 dias (pH = 4,0) e 15 dias (pH = 3,0) de estocagem, respectivamente. Os isolados de MM, por sua vez, tiveram maior valor de pH com 1 (pH = 3,7) e 60 (pH = 3,7) dias de ensilagem, enquanto menores valores foram observados em todos os tempos de estocagem avaliados (pH = 3,0-3,1).

**Tabela 1** - Crescimento (log UFC) e valores de pH de isolados de bactérias obtidos em silagens de grãos reidratados de milho em diferentes tempos de estocagem em dois meios de cultura (MP e MM).

Ensilagem	Meio de Cultura <sup>1</sup>	Total isolados	pH			Crescimento		
			Mín	Méd	Máx	Mín	Méd	Máx
1	MP	5	3,1	3,4	3,5	6,699	7,576	8,923
	MM	8	3,0	3,3	3,7	5,544	7,237	8,688
3	MP	4	3,1	3,4	3,6	5,845	6,664	7,491
	MM	4	3,0	3,4	3,4	6,000	6,921	7,772
5	MP	5	3,4	3,5	3,5	7,926	8,566	8,789
	MM	10	3,1	3,3	3,5	5,699	7,215	8,772
15	MP	10	3,0	3,2	3,7	6,653	7,468	7,905
	MM	14	3,1	3,3	3,6	5,653	7,098	5,653
30	MP	15	3,1	3,3	3,7	6,484	7,563	9,297
	MM	13	3,0	3,3	3,7	5,000	7,676	9,657
60	MP	11	3,7	3,8	4,0	7,966	8,717	9,409
	MM	11	3,1	3,3	3,7	6,477	7,871	9,674

<sup>1</sup>MP = meio MRS-Padrão; MM = meio MRS-Modificado

Todos os isolados avaliados foram capazes de reduzir o pH em extrato aquoso, característica desejável durante um processo de seleção de microrganismos iniciadores, uma vez que o pH é responsável por conservar o material ensilado (MUCK et al., 2018). Maior crescimento microbiano no extrato aquoso foi observado em isolados obtidos em ambos os meios de cultura com 30 e 60 dias de estocagem. Os resultados dos produtos da fermentação dos isolados estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2** - Produtos da fermentação (g/L) de isolados de bactérias obtidos em silagens de grãos reidratados de milho em diferentes tempos de estocagem em meio MRS-Padrão (MP).

Produtos da fermentação <sup>1</sup>	Ensilagem (dias)	1	3	5	15	30	60
	Nº isolados	2	0	3	6	4	4
Ácido lático	Mín	3,44	ND <sup>2</sup>	3,22	6,94	4,17	1,21
	Méd	4,06	ND	4,05	9,94	6,21	2,95
	Máx	4,68	ND	4,87	13,70	8,36	3,95
Ácido acético	Mín	0,08	ND	0,07	0,10	0,11	0,07
	Méd	0,10	ND	0,11	0,28	0,15	0,10
	Máx	0,11	ND	0,17	0,31	0,19	0,16
Etanol	Mín	0,00	ND	ND	0,29	ND	ND
	Méd	0,09	ND	ND	0,70	0,17	ND
	Máx	0,19	ND	ND	1,55	0,67	ND

<sup>1</sup>Ácido propiônico, ácido butírico e 1,2-propanodiol não foram detectados; <sup>2</sup>ND = abaixo do limite de detecção.

**Tabela 3** - Produtos da fermentação (g/L) de isolados de bactérias obtidos em silagens de grãos reidratados de milho em diferentes tempos de estocagem em meio MRS-Modificado (MM).

Produtos da fermentação <sup>1</sup>	Ensilagem (dias)	1	3	5	15	30	60
	Nº Isolados	2	1	5	3	5	4
Ácido lático	Mín	6,94	11,83	1,36	5,17	3,84	2,16
	Méd	9,72	11,83	7,82	8,28	5,22	6,80
	Máx	11,83	11,83	11,92	10,99	7,19	10,11
Ácido acético	Mín	0,17	0,30	0,09	0,08	0,07	0,08
	Méd	0,17	0,30	0,19	0,17	0,10	0,13
	Máx	0,17	0,30	0,31	0,22	0,16	0,23
Etanol	Mín	0,00	2,10	0,00	0,21	ND <sup>2</sup>	ND
	Méd	0,18	2,10	0,36	0,57	ND	ND
	Máx	0,37	2,10	1,78	0,89	ND	ND

<sup>1</sup>Ácido propiônico, ácido butírico e 1,2-propanodiol não foram detectados; <sup>2</sup>ND = abaixo do limite de detecção.

O ácido lático foi o ácido orgânico produzido em maior quantidade em todos os isolados avaliados, sendo superiores para quase todos aqueles obtidos em meio MM. O ácido lático é o principal composto encontrado em silagens bem fermentadas produzidos por BAL, além de ser responsável pela queda de pH (MUCK et al., 2018). Possivelmente, isolados obtidos em meio MM são mais eficazes em produzir ácido lático.

O ácido acético teve menor concentração em comparação ao ácido láctico para todos os isolados avaliados. Esse ácido é produto formado principalmente por bactérias do grupo das heterofermentativas obrigatórias, por exemplo, *Lactobacillus buchneri* (MUCK et al., 2018; PAHLOW et al., 2003). Em virtude disso, podemos pressupor que os microrganismos estudados provavelmente pertencem ao grupo de BAL homofermentativas, visto que o ácido láctico é o principal produto formado no seu metabolismo microbiano (ROOKE e HATFIELD, 2003). O etanol é um álcool formado a partir do metabolismo microbiano a partir da rota heterofermentativa de BAL (MUCK et al., 2018). Contudo, nem todos os isolados se mostraram capazes de produzir tal composto. No caso dos isolados a partir do meio MP, aqueles obtidos a partir de silagens com 5 e 60 d de fermentação são mais desejáveis em um processo de seleção. O mesmo pode ser observado nos isolados em meio MM com 30 e 60 d de fermentação.

## CONCLUSÕES

Os isolados obtidos foram capazes de crescer tanto em meio com glicose ou com caseína como fontes substrato. Os isolados foram capazes de reduzir o pH e mostraram ser mais eficientes em produzir ácido láctico do que acético durante a fermentação. Todos os isolados se mostram promissores como possíveis microrganismos iniciadores da fermentação. Novos testes devem ser realizados com o propósito de melhor caracterizá-los e entender as características de cada isolado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, B. F. et al. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 122, n. 3, p. 589-600, mar. 2017. Disponível em:<<https://doi.org/10.1111/jam.13371>>. Acesso em 23 de março de 2023.

MUCK, R. E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, American Dairy Science Association, v. 101, n. 5, maio/2018, p. 3980-4000. Disponível em:< <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>>. Acesso em 22 de Março de 2023

PAHLOW, G., et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Org). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy. 2003. cap. 2. p. 31-93.

ROOKE, J. A.; HATFIELD, R. D. Biochemistry of ensiling. In: Buxton, D. R.; Muck, R. E.; Harrison, J. H. (Eds). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy. 2003. cap. 3. p. 95-139.

SAARISALO, E. et al. 2007. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 327-336,

fev./2007. Disponível em:< <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03103.x>> Acesso em 19 de março de 2023.