



LÍLIAN DE BARROS MORAIS

**DIVERSIDADE DE FUNGOS EM SILAGENS DE MILHO
INOCULADAS COM *Lactobacillus buchneri* (CCMA1366)
OU *Lactobacillus farraginis* (CCMA1362)**

LAVRAS – MG

2019

LÍLIAN DE BARROS MORAIS

**DIVERSIDADE DE FUNGOS EM SILAGENS DE MILHO INOCULADAS COM
Lactobacillus buchneri (CCMA1366) OU *Lactobacillus farraginis* (CCMA1362)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de Mestra

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila
Orientadora

Dr. Luis Roberto Batista
Coorientador

Dra. Beatriz Ferreira Carvalho
Coorientadora

LAVRAS – MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Morais, Lilian de Barros.

Diversidade de fungos em silagens de milho inoculadas com
Lactobacillus buchneri (CCMA 1366) ou *Lactobacillus farraginis*
(CCMA 1362) / Lilian de Barros Moraes. - 2019.

69 p. : il.

Orientador(a): Carla Luiza da Silva Ávila.

Coorientador(a): Luís Roberto Batista, Beatriz Ferreira
Carvalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Fungos. 2. Silagem de milho. 3. Inoculante. I. Ávila, Carla
Luiza da Silva. II. Batista, Luís Roberto. III. Carvalho, Beatriz
Ferreira. IV. Título.

LÍLIAN DE BARROS MORAIS

**DIVERSIDADE DE FUNGOS EM SILAGENS DE MILHO INOCULADAS COM
Lactobacillus buchneri (CCMA1366) OU *Lactobacillus farraginis* (CCMA1362)**

**FUNGI DIVERSITY IN CORN SILAGES INOCULATED WITH *Lactobacillus*
buchneri (CCMA1366) OR *Lactobacillus farraginis* (CCMA1362)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de Mestra

APROVADA EM 12 de abril de 2019.

Prof. Dr. Luis Roberto Batista – UFLA/DCA
Prof. Dr. Patrick Schmidt – UFPR/DZO
Dra. Suzana Reis Evangelhista – UFLA/DBI

Prof. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila
Orientadora

LAVRAS – MG

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus em primeiro lugar por cada oportunidade de crescimento pessoal e profissional em minha vida e por me dar saúde e força para concluí-las.

À professora Dra. Carla Ávila pela orientação, paciência, confiança e ensinamentos. À Dra. Beatriz Carvalho pela coorientação, ensinamentos e auxílio constantes ao longo dos experimentos. Ao meu coorientador Dr. Luis Roberto Batista pelas valiosas contribuições.

À todos do nosso grupo de pesquisa pelo compartilhamento de conhecimentos e experiências. Aos alunos de Iniciação Científica, Iara, Letícia, Vivi, Luana e demais por acompanharem e auxiliarem nosso trabalho. Agradeço de modo especial ao meu companheiro de projeto, Sillas, com quem eu compartilhei todos os desafios ao longo do trabalho. Obrigada pela parceria.

À Universidade Federal de Lavras pela infraestrutura que possibilitou a execução do trabalho. Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e toda sua equipe de alunos, técnicos e servidores.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

À Cidinha pela paciência e responsabilidade para com nossas pesquisas.

Agradeço aos meus pais, Denise e Mário, por seus esforços incondicionais e por serem presença constante em minhas conquistas. Nenhuma delas seria possível se não fossem vocês. Agradeço a minha irmã, meus avós e familiares por estarem sempre ao meu lado em minhas decisões.

Ao meu namorado, Diogo, que tão pacientemente me acolheu nos momentos de ansiedade e preocupação. Obrigada por acreditar tanto em meu potencial e por me incentivar constantemente a buscar crescimento.

À Gabi, Kellynha e Fer que de maneira tão especial fizeram esses dois anos em Lavras passarem de maneira tão sutil. Obrigada por serem a minha família de Lavras,

por tanta empatia e amor. Todos deveriam ter a sorte de ter uma amizade como as nossas. Obrigada!

Às amigas que construí ao longo do percurso, Fabi, Suelen, Marcela, Thalissa, Carlos, Natasha. Foi um diferencial ter vocês nessa caminhada. Obrigada por compartilharem não só os momentos de tensão, mas principalmente os de alegria.

À todos que de uma forma ou outra contribuíram e possibilitaram esse trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é uma das forrageiras mais utilizadas na produção de silagem, porém apresenta suscetibilidade à deterioração aeróbia por microrganismos indesejáveis, como os fungos. O presente estudo teve como objetivo quantificar e identificar os fungos presentes na planta do milho e em silagens inoculadas com *Lactobacillus buchneri* (CCMA 1366) ou *Lactobacillus farraginis* (CCMA 1362). Três tratamentos foram utilizados: I) Controle (CON): Silagem de milho sem inoculação; II) Silagem de milho inoculada com *L. buchneri*; III) Silagem de milho inoculada com *L. farraginis*. As silagens foram estocadas por 29, 103 e 193 dias e foram analisadas quanto às populações microbianas fúngicas, matéria seca, pH, atividade de água (a_w) e produtos da fermentação (etanol, 1,2-propanodiol e ácidos acético, propiônico, butírico). Para análise dos dados a função *fat2.dic* do pacote *ExpDes.pt* do programa estatístico R foi utilizada. Dois contrastes foram testados para comparar: I) CON vs. *L. buchneri*, II) CON vs. *L. farraginis*. Significância foi declarada com $P < 0,05$. Gráficos de análise descritiva foram feitos para as contagens microbianas utilizando o pacote *ggplot2* do programa estatístico R. Todas as silagens apresentaram pH adequado, com valores mais baixos na silagem controle. As silagens inoculadas apresentaram maior concentração de ácido acético e 1,2 - propanodiol comparadas ao controle, indicando o estabelecimento efetivo das cepas. Cinco espécies de leveduras foram encontradas na planta fresca. *Candida glabrata* foi isolada das silagens controle e inoculada com *L. buchneri*. Na silagem inoculada com *L. farraginis* não houve crescimento de leveduras. Houve efeito do tempo na contagem de fungos filamentosos, com as maiores contagens no tempo 103 dias onde a espécie *A. fumigatus* foi predominante. Espécies dos gêneros *Fusarium*, *Phoma*, *Beauveria* foram isoladas da planta fresca. O gênero *Monascus* e a espécie *Aspergillus flavus* foram isolados nos tempos 29 e 103 dias, respectivamente. O trabalho permitiu estudar a dinâmica da população fúngica e da fermentação das silagens inoculadas, o que contribui para criação de estratégias para aumentar a estabilidade aeróbia, um grande desafio na silagem de milho.

Palavras-chave: Silagem. Milho. Fungos filamentosos. Micotoxina. Inoculante.

GENERAL ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is one of the most used forage for silage production, but it is susceptible to aerobic deterioration by undesirable microorganisms, such as fungi. The present study aimed to quantify and identify fungi present in corn plant and in silages inoculated with *Lactobacillus buchneri* (CCMA 1366) or *Lactobacillus farraginis* (CCMA 1362). Three treatments were used: I) Control (CON): Corn silage without inoculation; II) Corn silage inoculated with *L. buchneri*; III) Corn silage inoculated with *L. farraginis*. The silages were stored for 29, 103 and 193 days and analyzed for fungal microbial populations, dry matter, pH, water activity (a_w) and fermentation products (ethanol, 1,2-propanediol and acetic, propionic, butyric acids). For data analysis, the `fat2.dic` function of the `ExpDes.pt` package of the statistical program R was used. Two contrasts were tested to compare: I) CON vs. *L. buchneri*, II) CON vs. *L. farraginis*. Significance was declared with $P < 0.05$. Descriptive analysis charts were made for the microbial counts using the `ggplot2` package of the statistical program R. All silages presented adequate pH, with lower values in the control silage. The inoculated silages had a higher concentration of acetic acid and 1,2 - propanediol compared to the control, indicating the effective establishment of the strains. Five yeast species were found in the fresh plant. *Candida glabrata* was isolated from the control silage and silage inoculated with *L. buchneri*. No growth of yeasts occurred in the silages inoculated with *L. farraginis*. The highest count of filamentous fungi was observed in time 103 days where *Aspergillus fumigatus* was predominant. Species of the genus *Fusarium*, *Phoma*, *Beauveria* were isolated from fresh forrage. The genus *Monascus* and the species *Aspergillus flavus* were isolated from 29 and 103 days, respectively. This work showed the dynamics of the fungal population and the fermentation of the inoculated silages, which contributes to the creation of strategies to increase aerobic stability, a major challenge in corn silage.

Keywords: Silage. Corn. Filamentous fungi. Mycotoxin. Inoculant.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| PRIMEIRA PARTE..... | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 13 |
| 2.1 – Silagem de milho e crescimento fúngico..... | 13 |
| 2.2 - Micotoxinas em silagem de milho..... | 16 |
| 2.3 - Efeito da ingestão de micotoxinas pelos animais..... | 20 |
| 2.4 -Bactérias do Ácido Lático e Inoculantes Microbianos..... | 21 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 25 |
| SEGUNDA PARTE..... | 30 |
| ARTIGO: DIVERSIDADE DE FUNGOS EM SILAGENS DE MILHO INOCULADAS COM <i>Lactobacillus buchneri</i> (CCMA1366) OU <i>Lactobacillus farraginis</i> (CCMA1362) | 30 |
| RESUMO..... | 31 |
| ABSTRACT..... | 32 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 33 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 35 |
| 2.1 Inoculantes..... | 35 |
| 2.2 Ensilagem..... | 35 |
| 2.3 Procedimentos Analíticos..... | 36 |
| 2.4 Análises Microbiológicas..... | 36 |
| 2.5 Avaliação da diversidade fúngica..... | 37 |
| 2.5.1 MALDI-TOF MS..... | 37 |
| 2.6 Isolamento de fungos, a_w, e pH das silagens após 24 horas de exposição ao ar..... | 38 |
| 2.7 Avaliação do potencial micotoxigênico de isolados do gênero <i>Aspergillus</i> seção Flavi..... | 38 |
| 2.8 Avaliação da produção de citrinina por fungos do gênero <i>Monascus</i>..... | 38 |
| 2.9 Análises estatísticas..... | 39 |
| 3 RESULTADOS..... | 40 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.1 | Planta fresca e silagens..... | 40 |
| 3.1.1 | Características microbiológicas e químicas..... | 40 |
| 3.2 | Características das silagens após exposição aeróbia..... | 44 |
| 3.2.1 | Características microbiológicas e químicas..... | 44 |
| 3.3 | Identificação das leveduras e fungos filamentosos..... | 47 |
| 3.3.1 | Identificação de leveduras e fungos filamentosos na planta fresca e nas silagens..... | 47 |
| 3.3.2 | Identificação de fungos filamentosos nas silagens após exposição aeróbia..... | 54 |
| 3.4 | Avaliações do potencial micotoxigênico..... | 56 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 57 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 64 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 65 |

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A ensilagem é a forma de conservação da planta do milho, para que a mesma possa ser utilizada ao longo do ano na alimentação de ruminantes (HERRMANN et al., 2015). O milho se destaca como a forrageira mais utilizada no mundo todo para ensilagem, pois apresenta teores de carboidratos solúveis, poder tampão e teores de matéria seca (MS), que associados propiciam boa fermentação e alto conteúdo energético, com grande aceitabilidade pelos animais (ALLEN et al., 2003; KHAN et al., 2015).

Apesar dessas características, boas práticas de manejo do silo são essenciais para garantir a qualidade da silagem, pois é um substrato que pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis tais como os fungos filamentosos (FF) e leveduras (DRIEHUIS et al., 2018; OGUNADE et al. 2018). Na abertura do silo, a exposição ao oxigênio favorece o crescimento de fungos e leveduras, e essas últimas tem sido as principais responsáveis por iniciar o processo de deterioração aeróbia (MUCK et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2005).

A contaminação da silagem com fungos filamentosos (FF) é preocupante, pois além de provocarem a deterioração da mesma, muitas linhagens desses organismos são capazes de produzir micotoxinas (OGUNADE et al. 2018). Fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* são os mais preocupantes quanto a produção de micotoxinas, sendo capazes de produzir por exemplo, ocratoxina A (OTA), aflatoxinas (AF) e zearalenona (ZEA) (CHAUHAN et al., 2016). A quantidade e o tipo de micotoxina produzida é variável, podendo sofrer influência da espécie de fungo, disponibilidade de água, temperatura, pH e nutrientes (MAGAN et al., 2011). Além disso, práticas agrícolas inadequadas de colheita, compactação, vedação, armazenamento e transporte podem influenciar no risco de contaminação por fungos filamentosos e, conseqüentemente, na produção de micotoxinas (MARIN et al., 2013).

Os efeitos da ingestão de micotoxinas pelos animais são variáveis em função do tipo e concentração da micotoxina, podendo haver, entre outros, redução do valor nutricional, redução na palatabilidade, da fertilidade e maior suscetibilidade às doenças (CHELI et al. 2013). As micotoxinas ingeridas pelos animais podem sofrer biotransformação e contaminar os produtos alimentares de origem animal, como leite e

carne, afetando também a saúde humana (OGUNADE et al., 2018). Em função dessa preocupação, vem crescendo o número de trabalhos conduzidos e publicados em relação a esse tema (CARVALHO et al., 2016; DRIEHUIS et al., 2008; DRIEHUIS, 2011; GARON et al., 2006; PEREYRA et al., 2008; SCHMIDT et al., 2015).

Ainda não está bem elucidado se o processo fermentativo característico da ensilagem promove alguma modificação nas micotoxinas presentes. Alguns trabalhos (JI et al., 2016; PATRIARCA & PINTO, 2017; SHETTY & JESPERSEN, 2006; VERHEECKE et al., 2016) relatam a capacidade de biotransformação de determinadas micotoxinas por microrganismos, inclusive bactérias do ácido lático, presentes nas silagens. No entanto, outros autores não verificaram alterações em silagens inoculadas e não inoculadas com fungos produtores das toxinas fumonisina, deoxinivanelol e zearalenona (UEGAKI et al. 2013). Com relação à origem, Uegaki et al. (2013), acreditam que as micotoxinas presentes em silagens de milho são produzidas quase que exclusivamente na pré-colheita e não durante a ensilagem.

Inoculantes microbianos podem ser utilizados na ensilagem do milho, sendo o controle da deterioração aeróbia, a principal justificativa desta prática, devido a propensão dessas silagens à deterioração. Inoculantes selecionados com esse propósito podem ser mais efetivos e quando corretamente empregados podem contribuir para diminuir as perdas e potencializar a preservação da qualidade nutricional, aumentar a estabilidade aeróbia da silagem e beneficiar o desempenho animal (MUCK et al., 2018; SIQUEIRA, 2013).

De uma forma geral, a contaminação de culturas por FF e a potencial produção de micotoxinas é responsável por sérios riscos à saúde animal e humana, podendo inclusive representar uma barreira econômica para países que exportam tais produtos. A melhor forma de evitar a produção de micotoxinas é evitando o crescimento dos fungos que as produzem. Muitas espécies de fungos presentes na forragem fresca e na silagem já são conhecidos. No entanto, são ainda raros os dados sobre a sobrevivência desses fungos aos processos fermentativos de silagens produzidas em clima tropical, assim como a ocorrência e/ou alteração durante esses processos das micotoxinas possivelmente presentes. Dessa forma, estudar a diversidade de FF na silagem de milho é fundamental para conhecer a origem da contaminação e para desenvolver estratégias de prevenção e controle de crescimento fúngico.

2 - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 – Silagem de milho e crescimento fúngico

O milho (*Zea mays* L.) se destaca entre as forrageiras utilizadas para a produção de silagem, pois quando colhido com matéria seca (MS) adequada (30-35%) apresenta baixa capacidade tampão, concentração adequada de carboidratos solúveis (CS) para fermentação e alto conteúdo energético (ALLEN et al., 2003; NUSSIO et al., 2001). Além disso, apresenta grande aceitabilidade pelos animais e possibilidade e facilidade em mecanizar o processo de ensilagem (EVANGELISTA & LIMA, 2000; KHAN et al., 2015).

Um grande desafio na produção da silagem de milho é sua suscetibilidade à deterioração aeróbia por microrganismos indesejáveis. Por serem capazes de crescer em pH ácido, as leveduras dão início a esse processo de deterioração no estágio de abertura do silo, onde a entrada de oxigênio favorece ainda mais sua proliferação (MUCK, 2010). A degradação de ácido lático em CO₂ e H₂O por essas leveduras ocasiona um aumento do pH da massa ensilada, o que por sua vez possibilita o crescimento de outros microrganismos deteriorantes, como fungos filamentosos e bactérias aeróbias (*Bacillus* sp. e *Listeria* sp.) (MUCK, 2010). Assim como as leveduras, algumas bactérias do ácido acético, pertencentes principalmente ao gênero *Acetobacter*, também podem ser iniciadoras da deterioração, pois toleram baixo pH e são capazes de utilizar álcool para crescer (MUCK, 2010; PAHLOW et al., 2003).

Os fungos filamentosos também tem papel significativo na deterioração aeróbia da silagem. Eles estão amplamente distribuídos na natureza e são capazes de contaminar culturas agrícolas como o milho, pois esse é um alimento cuja composição de carboidratos, lipídeos e proteínas servem como substrato adequado para o seu desenvolvimento (GUIMARÃES et al., 2010; GRANADA et al., 2003). Eles são decompositores ativos de matéria orgânica podendo quebrar açúcares e ácido lático disponíveis, além de possuírem sistema enzimático especializado que lhes permitem degradar a celulose presente na parede celular vegetal (DEACON, 2006). Dessa forma, tanto a forragem quanto a silagem de milho oferecem condições nutricionais adequadas que permitem e favorecem o crescimento de fungos filamentosos.

Assim, a contaminação fúngica da silagem pode ocorrer em função das culturas forrageiras possuírem uma microbiota epifítica diversificada que inclui fungos patogênicos, comensais ou saprófitas associados ao desenvolvimento da planta (O'BRIEN et al., 2008). Esses microrganismos epifíticos podem produzir esporos, estruturas resistentes a condições de estresse (DEACON, 2006) e assim sobreviver nas condições ácidas e de anaerobiose durante o período de ensilagem, retomando seu crescimento vegetativo na abertura do silo.

Além disso, a contaminação também pode ocorrer durante o processamento da forrageira para ensilagem por fungos provenientes do ar e do solo (O'BRIEN et al., 2008). Fungos dos gêneros *Fusarium*, *Alternaria*, as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são comumente encontrados na planta fresca, enquanto que as condições após a ensilagem favorecem outros fungos como *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Aspergillus fumigatus*, *Monascus ruber*, que se desenvolvem principalmente em silagens mal gerenciadas (DRIEHUIS et al., 2018).

O crescimento de fungos em silagens está associado a perdas de MS e redução na qualidade nutricional da silagem, por exemplo, a diminuição do conteúdo de amido (BORREANI et al., 2018). Em geral, o crescimento ocorre principalmente em partes mais periféricas do silo e durante o desabastecimento, pois como em sua maioria os fungos são organismos aeróbios obrigatórios, seu desenvolvimento ocorre em áreas oxigenadas (DUNIÈRE et al., 2013; SPADARO et al., 2015).

À vista disso, é possível haver variação entre as silagens do centro e das partes periféricas do silo, como observado no trabalho de Oliveira et al. (2017), que avaliaram amostras de silagem de milho, do centro e do topo do silo, oriundas de 32 fazendas leiteiras. Os autores verificaram que as silagens do topo do silo (344 g kg⁻¹ de MS, 291 g kg⁻¹ MS de amido, 58,3 g kg⁻¹ MS de ácido láctico) apresentaram reduzido valor nutritivo comparadas às silagens do centro do silo (351 g kg⁻¹ de MS, 308 g kg⁻¹ MS de amido 70,4 g kg⁻¹ MS de ácido láctico), devido ao maior desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos e maior deterioração aeróbia. Na revisão de Borreani et al. (2018) os autores, sumarizando vários trabalhos, verificaram que há um aumento significativo na perda de MS relativo ao aumento na contagem de fungos filamentosos em silagens. Ainda de acordo com os autores, mudanças na qualidade da silagem, como redução no conteúdo de amido, puderam ser observadas em silagens que apresentavam contagens acima de 5 log UFC /g.

Além disso, durante seu metabolismo os fungos produzem compostos orgânicos voláteis, tais como cetonas, ésteres e alcóois que são responsáveis pelo cheiro de bolor característico de silagens mofadas (GREMMELS et al., 2008). A presença de mofos na silagem prejudica a palatabilidade da mesma e como consequência a ingestão é reduzida comprometendo o desempenho animal, além de causarem irritações nos olhos e no sistema respiratório humano (MUCK et al., 2018; O'BRIEN et al., 2005).

Alguns fatores como compactação inadequada na hora da ensilagem, má vedação do silo, culturas com alto teor de MS e baixas taxas de fermentação favorecem o desenvolvimento de fungos filamentosos na silagem (PAHLOW et al., 2003). Em regiões de clima tropical a deterioração pode ser ainda mais intensificada, pois o clima quente e úmido cria condições ótimas para o crescimento desses microrganismos indesejáveis (BERNARDES et al., 2018). Entretanto, os fungos não apresentam bom desenvolvimento em pH ácido e em condições de anaerobiose (McDONALD et al., 1991), sendo assim, uma silagem produzida em condições adequadas que possibilite um rápido abaixamento do pH e estabelecimento das condições anóxicas é fundamental para reduzir as chances de contaminação.

Além das leveduras e fungos filamentosos já mencionados, outros microrganismos também podem contribuir para a deterioração da silagem de milho. O gênero *Clostridium* possui algumas bactérias que, além de serem patogênicas, também são responsáveis pela deterioração anaeróbica, através do consumo do ácido láctico (DUNIÈRE et al., 2013). As enterobactérias são outro grupo de microrganismos associados a deterioração anaeróbia. Elas são competidoras com as BAL pelos açúcares, porém a fermentação que realizam não é desejável e também podem produzir compostos tóxicos, como aminas biogênicas (OUDE ELFERINK, 2000).

Após mudança no pH e temperatura ocasionada por contaminações anteriores na fase de exposição aeróbia, espécies do gênero *Listeria* e *Bacillus* podem se desenvolver na silagem e contribuir para deterioração. Esses gêneros também possuem espécies patogênicas como a espécie *L. monocytogenes* responsável por causar listeriose, uma doença com alta taxa de mortalidade e de origem alimentar para ruminantes sendo a silagem a principal fonte de alimentação desses animais (DRIEHUIS et al., 2018; QUEIROZ et al., 2018).

2.2 – Micotoxinas em silagem de milho

Além da deterioração que ocasiona perdas no conteúdo energético e nutritivo, a contaminação por fungos na silagem também pode significar risco à saúde animal e humana, ou pela presença do microrganismo em si ou pela produção de metabólitos tóxicos, como as micotoxinas (DRIEHIUS et al., 2018). As micotoxinas são compostos naturais de baixo peso molecular produzidos no metabolismo secundário de fungos filamentosos, que podem causar morte ou doenças aos seres humanos e outros animais (BENETT & KLICK, 2003). Os metabólitos secundários são compostos não essenciais à sobrevivência e crescimento dos microrganismos, ao contrário dos produtos do metabolismo primário que são necessários ao crescimento e reprodução (BRAKHAGE & SCHROEKHE, 2010).

Diferentes espécies de fungos podem produzir diferentes variedades e quantidades de metabólitos em função das condições de cultivo que podem diferir em relação a disponibilidade de água, nutrientes, pH e temperatura (MAGAN et al, 2011). Os principais gêneros envolvidos na produção de micotoxinas são *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (BENETT & KLICK, 2003). As espécies desses gêneros são responsáveis pela produção das principais micotoxinas alimentares de relevância na saúde pública, por exemplo, as aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A e tricotecenos (WU et al., 2014).

Ainda se discute muito a razão pela qual os fungos produzem micotoxinas, assim como em quais condições. Na revisão de Ogunade et al. (2018) os autores discutem alguns fatores que predispõe a silagem à contaminação fúngica e produção de micotoxinas, podendo ser eles o pH, a temperatura, a atividade de água (a_w), a atividade de insetos ou estresse oxidativo. Já se sabe também que a síntese desses metabólitos secundários envolve enzimas únicas ao processo e não relacionadas ao metabolismo primário, além de ser uma via biossintética com grande despêndio energético ao organismo e que pode ser regulada por fatores ambientais (MAGAN & ALDRED, 2007).

Dentre as possíveis funções das micotoxinas, discute-se que elas possam ser produtos de detoxificação ou compostos produzidos em condições desfavoráveis ao crescimento (MAGAN & ALDRED, 2007). O ambiente ácido e anaeróbico nos silos durante a fermentação pode se tornar um agente estressante para fungos filamentosos possivelmente presentes. Carvalho et al. (2016) observaram uma correlação entre a

concentração de ocratoxina e o pH em silagens de milho. Nesse trabalho, silagens com menores valores de pH estavam mais associadas a presença dessa micotoxina. Alguns autores discutem que a vantagem mais provável da produção de micotoxinas pelos fungos seria a capacidade de competir e sobreviver em seus ambientes onde estão expostos a condições adversas e vários competidores (FOX & HOWLETT, 2008).

Assim, apesar de haver grande discussão a respeito de qual é o papel das micotoxinas e em quais situações elas são sintetizadas há muitos fatores a serem considerados. A produção de micotoxina deve ser avaliada em cada contexto de acordo com a linhagem do fungo toxigênico e considerando presença ou ausência de estresse ambiental, nutricional, interações/competição e as condições naturais ou laboratoriais.

Nas culturas agrícolas a produção de micotoxinas pode ocorrer em vários momentos como antes da colheita, durante a colheita e secagem e também no armazenamento. Assim, o risco de contaminação e produção de micotoxinas pode sofrer influência das práticas agrícolas da colheita até o armazenamento e transporte, pois se essas não forem adequadas, podem promover o crescimento de fungos e assim aumentar o risco de produção e contaminação com micotoxinas (MARIN et al., 2013).

Em relação aos fungos produtores de micotoxinas, nas forrageiras previamente à ensilagem, as principais espécies encontradas pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Alternaria* e *Aspergillus*. Já durante o processo de ensilagem predominam os fungos *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus fumigatus*, *P. paneum*, *Zygomycetes fumigatus* e *Byssochlamys nivea* (CHELI et al., 2013; STORM et al., 2014). As principais micotoxinas relacionadas com a presença de *Fusarium* nas silagens são os tricotecenos, o deoxinivalenol, fumonisinas e zearalenona, enquanto que micotoxinas associadas com contaminação pelo gênero *Aspergillus* são principalmente as aflatoxinas e ocratoxinas (OGUNADE et al., 2018). Já para contaminações com o gênero *Penicillium* as micotoxinas mais encontradas nas silagens são a ocratoxina, o ácido micofenólico e roquefortinas e citrinina (GALLO et al., 2015).

A presença de fungos filamentosos deteriorantes produtores de micotoxinas, por si só, não indica que houve produção de micotoxina (RODRÌGUEZ et al., 2015). A produção de micotoxinas e a ativação dos genes envolvidos nessa biossíntese respondem a estímulos ambientais e/ou condições de estresse (FOX & HOWLETT, 2008; MUCK, 2010; REVERBERI et al., 2010). Dessa forma, silagens mofadas não

necessariamente estarão contaminadas com toxinas, pois comumente as condições ideais (temperatura, pH, atividade de água ótimos) que permitem o crescimento fúngico podem ser diferentes das condições nas quais ocorre produção de micotoxinas (CHELI et al., 2013).

Outra possibilidade é que as micotoxinas permaneçam presentes mesmo após a morte do fungo, ou seja, sem a presença de contaminação ou deterioração visível (CARVALHO et al., 2016). Isso pode ocorrer em função de alguns desses compostos serem estáveis e resistirem a certas práticas de processamento dos alimentos (ANFOSSI et al., 2016). Assim, enquanto os fungos são eliminados durante essas práticas, as toxinas permanecem presentes, muitas vezes não alterando a aparência do alimento, não sendo assim, detectáveis sem o uso de métodos e técnicas especiais (BENNETT & KLICK, 2003).

Alterações nas micotoxinas presentes em silagem de milho, assim como na sua ocorrência, em função dos processos fermentativos que ocorrem durante a ensilagem são pouco relatadas e esclarecidas. Entretanto, no trabalho de Aiko et al. (2016) testou-se a capacidade dos ácidos orgânicos láctico, acético e cítrico em degradar a micotoxina aflatoxina B₁. De acordo com os resultados o ácido láctico foi o mais eficiente na degradação da AFB₁ em AFB_{2a}, que por vez apresenta reduzida toxicidade. Além disso, muitos trabalhos (JI et al., 2016; MA et al., 2017; PATRIARCA & PINTO, 2017; SHETTY & JESPERSEN, 2006; VERHEECKE et al., 2016) descrevem a capacidade de degradação biológica de certas micotoxinas por microrganismos, inclusive BAL que estão presentes na ensilagem. No trabalho de Khanafari et al. (2007) a cepa *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 apresentou eficiência de 77% na degradação de AFB₁ após 7 dias a 37°C, em amostras de milho artificialmente contaminadas com 0,24 mg/kg de AFB₁. Dessa forma, alterações nas micotoxinas durante a ensilagem são possíveis de ocorrer, uma vez que as BAL fazem parte desse processo e o ácido láctico é um dos principais ácidos produzidos e utilizados na conservação da forragem.

Atualmente já se sabe das propriedades carcinogênicas, teratogênicas, mutagênicas e imunossupressoras das micotoxinas (WU et al., 2014; SOUZA et al., 2017). Nesse sentido, muitos estudos são realizados para detectar presença de fungos em silagens e a ocorrência de micotoxinas, de forma a contribuir para o esclarecimento dos impactos econômicos e sobre a saúde animal e humana dessa problemática.

No trabalho de Pereyra e colaboradores (2008) mais de 90% das amostras de silagens de milho testadas, produzidas na Argentina, apresentaram contaminação fúngica, onde as espécies *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* foram as espécies prevalentes. Os autores puderam verificar ainda a contaminação de algumas das amostras com as micotoxinas aflotoxina B₁, zearalenona, deoxinivalenol e fumonisina B₁. A espécie *P. roqueforti* é resistente a ambientes ácidos, com baixas temperaturas e com baixas concentrações de oxigênio sendo frequentemente encontrada em silagens de milho bem preservadas e as micotoxinas que produz, roquefortina C e ácido micofenólico, já foram detectadas em amostras de silagem (DRIEHUIS et al., 2008). No trabalho de Driehuis et al. (2008) as micotoxinas mais prevalentes encontradas foram deoxinivalenol, zearalenona, ácido micofenólico e roquefortina C, com destaque para as duas últimas, cujas concentrações foram extremamente altas em amostras de silagem de milho de áreas mofadas, até 45 e 25 mg. kg⁻¹, respectivamente.

Alguns estudos realizados com silagens de milho produzidas em regiões tropicais puderam verificar que, as micotoxinas zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas e roquefortina C foram as mais encontradas (GARON et al., 2006; DRIEHUIS, 2011). O estudo de Carvalho et al. (2016), também com silagens de milho de clima tropical, identificou aflatoxinas, ocratoxina e zearalenona como as mais frequentes, sendo a espécie de fungo *A. fumigatus* detectada em todas silagens que apresentavam mofos. Em um trabalho com silagens de milho provenientes de cinco diferentes regiões do Brasil, em mais de 91% das amostras foram encontradas micotoxinas, sendo a micotoxina zearalenona a mais prevalente (SCHMIDT et al., 2015).

Apesar dos problemas relacionados às micotoxinas ainda não há no Brasil uma legislação estabelecendo os limites máximos de ocorrência das mesmas em silagens. A Comissão das Comunidades Européias, por sua vez, já estabeleceram uma recomendação de limites de certas micotoxinas em produtos com destino à alimentação de animais, com base em 12% de matéria seca, tais como 5 mg/kg de deoxinivalenol, 0,5 mg/kg de zearalenona e 50 mg/kg de fumonisinas B1 mais B2. Os limites são estabelecidos em função do tipo de alimentação, idade animal e tipo de produto final com destino ao consumo humano (European Commission, 2006).

Dessa forma, a presença de micotoxinas na silagem implica em duas principais problemáticas, o risco que oferecem à saúde animal e as consequentes perdas na produção e ao perigo que representam à segurança de produtos alimentícios de origem animal (DRIEHIUS et al., 2018).

2.3 – Efeito da ingestão de micotoxinas pelos animais

O estudo do efeito da ingestão de micotoxinas pelos animais exige complexos planejamentos de experimentos com animais e sofre influência de fatores relacionados à micotoxina em si, ao animal e a fatores ambientais (GALLO et al., 2015). A presença de micotoxinas na silagem pode estar associada à redução do valor nutricional, redução na palatabilidade e consequente diminuição no consumo, diminuição da produção, da fertilidade e maior suscetibilidade às doenças (CHELI et al. 2013). De acordo com a extensa revisão realizada por Gallo et al. (2015) dentre os efeitos já relatados em estudos *in vivo*, a ingestão de micotoxinas por ruminantes pode ocasionar redução na motilidade do rúmen, inibição de crescimento, redução da eficiência reprodutiva, redução da produção de leite, lesão hepática, imunossupressão, dificuldade de locomoção, entre outros.

Os ruminantes são mais resistentes às micotoxinas quando comparados a animais monogástricos em função de possuírem uma microbiota ruminal com certa capacidade de detoxificação podendo degradar e inativar algumas micotoxinas (WAMBACQ et al., 2016). Por exemplo, as ocratoxinas são transformadas em ocratoxina-alfa e esse processo é denominado detoxificação e é realizado pela microbiota do rúmen, entretanto, esse processo pode sofrer variações em função de mudanças na dieta animal ou devido a doenças metabólicas, como a acidose ruminal (GREMMELS, 2008). Por outro lado outras micotoxinas, tais como as fumosinas e deoxinivalenol, podem não sofrer nenhum tipo de degradação ao passarem pelo rúmen, ou então, em um cenário pior, o metabolismo de algumas micotoxinas as transformam em compostos mais tóxicos, como no caso das aflatoxinas convertidas em aflatoxicol (DÄNICKE et al., 2005). As aflatoxinas são metabolizadas pelos ruminantes no fígado e excretadas na bile e a exposição prolongada a esses compostos pode gerar redução da taxa de crescimento, recusa alimentar, redução na produção de leite e, consequente, redução no desempenho animal (PEREYRA et al., 2008).

A detecção e identificação das micotoxinas em silagens de milho se faz necessária, pois além de causar prejuízos à saúde animal, também representam um risco à cadeia produtiva de alimentos. Como já relatado, as micotoxinas podem entrar nessa cadeia através do crescimento de FF e produção de micotoxinas nos alimentos destinados aos animais, podendo então ser metabolicamente acumuladas em órgãos e tecidos e serem ingeridas através do consumo de carne, leite e ovos (MARIN et al., 2013). De acordo com Pereyra et al. (2008) a aflatoxina B1 quando consumida em altas quantidades é convertida em AFM₁ e esse metabólito pode ser encontrado no leite em até 12 horas. Quando ingerida pelo animal, a ocratoxina A pode se acumular no músculo e assim causar efeitos adversos em humanos que consomem a carne (OGUNADE et al., 2018).

De acordo com Carão et al. (2014) três abordagens podem ser utilizadas para reduzir e evitar os efeitos da contaminação por micotoxinas. A primeira é a prevenção da contaminação fúngica do produto (tratamento químico de acidificação e amonização), segundo a detoxificação do alimento através da inativação das micotoxinas (tratamento térmico, irradiação ultravioleta e gama) de forma a preservar o valor nutritivo e a palatabilidade do alimento e terceiro impedir a absorção desses compostos no trato gastrointestinal dos animais. Essa última abordagem é amplamente utilizada na nutrição animal e se dá através de método físico de detoxificação com o uso de adsorventes minerais, orgânicos ou sintéticos, que são capazes de se ligar nas micotoxinas, formando um complexo adsorvente-micotoxina, que é então eliminado nas fezes do animal (DI GREGÓRIO et al., 2014).

2.4 – Bactérias do Ácido Lático e Inoculantes microbianos

Com o objetivo de reduzir os prejuízos associados aos microrganismos indesejáveis, melhorar não só a estabilidade aeróbia, mas também o processo fermentativo e reduzir as perdas associadas, o uso de inoculantes microbianos vêm se tornando uma prática comum.

As bactérias do ácido lático, presentes naturalmente na planta do milho, são o principal grupo de microrganismos responsáveis pela fermentação espontânea e conservação da forragem durante a ensilagem. Em cultivares de milho as espécies de BAL comumente encontradas são pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*,

Streptococcus, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (PAHLOW et al., 2003). Entretanto, elas também são utilizadas como aditivos microbianos para melhorar a fermentação, a estabilidade aeróbia e reduzir as perdas de nutrientes e de matéria seca, sendo a eficiência das mesmas influenciada pela compatibilidade entre a forrageira e o microrganismo selecionado (ASSIS et al., 2014).

A seleção de microrganismos para serem empregados como inoculantes para ensilagem de milho, deve avaliar características desejáveis como capacidade de inibir microrganismos aeróbios deterioradores e patogênicos, realizar preferencialmente via heterofermentativa, tolerância à acidez, entre outros (MUCK et al., 2018; SIQUEIRA, 2013; ZOPOLLATTO et al., 2009). Assim, a obtenção de microrganismos com tais características garante a eficiência do inoculante que, quando corretamente empregado, pode reduzir perdas de MS e potencializar a preservação da qualidade nutricional, aumentar a estabilidade aeróbia da silagem e por consequência beneficiar o desempenho animal (SIQUEIRA, 2013).

Embora a planta do milho tenha alta ensilabilidade, o uso de inoculantes é benéfico principalmente quando o gerenciamento do processo não é realizado adequadamente, como quando a colheita do milho é realizada com concentração de MS inadequada ou quando a compactação, vedação e desabastecimento são inadequados (GALLO et al., 2018).

As bactérias do ácido lático homofermentativas ou heterofermentativas são aplicadas isoladamente ou em conjunto dependendo da forrageira a ser ensilada e do que se deseja melhorar no processo de ensilagem. As primeiras são as mais comuns e há mais tempo empregadas como inoculantes e são capazes de metabolizar a glicose quase exclusivamente em ácido lático (cerca de 87% dos metabólitos produzidos) (MUCK et al., 2018; SANTOS et al., 2013). As bactérias heterofermentativas são desejáveis, principalmente em silagem de milho que apresenta propensão à deterioração, pois contribuem para a estabilidade aeróbia, uma vez que dentre os produtos formados no seu metabolismo está o ácido acético que apresenta efeito antimicrobiano, podendo inibir fungos filamentosos e leveduras indesejáveis (MUCK et al., 2018).

Parâmetros como teor de MS, pH, carboidratos solúveis, ácidos orgânicos, estabilidade aeróbia, entre outros são utilizados para avaliar o efeito dos inoculantes microbianos sobre a silagem. Tais parâmetros podem diferir em função da aplicação

de BALs homofermentativas ou heterofermentativas. Blajman et al. (2018) realizaram uma meta-análise de 276 estudos e concluíram que o tipo de BAL (homo ou heterofermentativa) administrada foi o fator mais significativo sobre a qualidade da silagem. Com os trabalhos analisados confirmou-se a característica das BAL heterofermentativas em produzir silagens com pH mais elevado e menor recuperação de MS quando comparadas com homofermentativas. Isso porque a cada mol de glicose fermentada pela via heterofermentativa 1 mol de CO₂ é produzido, enquanto que na homofermentação apenas o lactato é produzido (BORREANI et al., 2018). Entretanto, a estabilidade aeróbia é aumentada pelas BAL heterofermentativas e nenhum efeito foi observado para esse parâmetro para a adição de BAL homofermentativas. Já em outra recente meta-análise que analisou 130 experimentos empregando BAL homofermentativas ou heterofermentativas facultativas não foi observado efeito da inoculação no pH, na MS e na recuperação de MS nas silagens de milho e sorgo, porém em outras culturas como gramíneas e alfalfa houve efeito (OLIVEIRA, et al., 2017). Nesse trabalho, o tipo de forragem foi o fator mais significativo na qualidade das silagens em resposta à inoculação.

As diferenças metabólicas entre BAL homo e heterofermentativas resultam em diferentes perfis fermentativos da silagem que são comumente avaliados através das concentrações obtidas dos ácidos láctico, acético, propiônico, butírico e do 1,2 – propanodiol e etanol. A produção de ácido acético por bactérias heterofermentativas obrigatórias tem sido o principal fator para explicar como essas bactérias promovem o aumento da estabilidade aeróbia. Isso porque o ácido acético é um ácido fraco e encontra-se não dissociado no pH da silagem, o que lhe confere propriedades antifúngicas (MUCK et al., 2003; MUCK, 2010). Todavia, Muck et al. (2018) relatam a possibilidade de existir outros modos de ação, uma vez que já verificou-se a produção de compostos antifúngicos diferentes em silagens inoculadas com BAL, como por exemplo, ácido benzóico e ácido salicílico.

Uma quantidade significativa de outros metabólitos são também produzidos, reforçando que há diferença na maneira como inoculantes homo e heterofermentativos conduzem o processo fermentativo, o que pode ser verificado através de estudos metabolômicos, como o trabalho realizado por Xu et al. (2019). Os autores encontraram além dos ácidos orgânicos, compostos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, compostos aromatizantes e aminoácidos que por sua vez podem

contribuir para uma melhor compreensão sobre o perfil fermentativo, nutricional e funcional da silagem.

Devido as perdas de MS associadas à fermentação heterolática serem compensadas pela melhoria significativa da estabilidade aeróbia as pesquisas atuais tem tido grande foco no estudo e seleção de outras espécies de BAL heterofermentativas obrigatórias, além de *L. buchneri*, por exemplo, *L. hilgardii*, *L. kefirii*, *L. brevis* (MUCK et al., 2018). Isso porque *L. buchneri* se torna dominante em fermentações prolongadas e realiza conversão metabólica de ácido láctico à ácido acético de forma lenta, tornando assim necessário a investigação de novas espécies capazes de produzir melhorias mais rápidas na estabilidade aeróbia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKO, V.; EDAMANA, P.; MEHTA, A. Decomposition and detoxification of aflatoxin B₁ by lactic acid. **J Sci Food Agric**, v.96, p. 1959-1966, 2016.
- ALLEN, M. S.; COORS, J. G.; ROTH, G. W. **Corn silage**. In: *Silage Science and Technology*. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrisoni (eds). ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, v. 42, p. 547-608, 2003.
- ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; BAGGIANI, C. Mycotoxin detection. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 120-126, 2016.
- ASSIS, F.G.V. et al. New inoculants on maize silage fermentation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 43 (8): 395-403, 2014.
- BENNETT, J.W. e KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, 16, 497–516, 2003.
- BERNARDES, T.F. et al. Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. **Journal of Dairy Science**, v.101, n. 5, 2018.
- BLAJMAN, J.E. et al. A meta-analysis on the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v.125, p.1655-1669, 2018.
- BORREANI, G. et al. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.
- BRAKHAGE, A. A.; SCHROEKHE, V. Fungal secondary metabolites: strategies to active silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 48, n. 1, p. 16-22, Jan. 2010.
- CARÃO, A.C.P. et al. Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflotoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 699-705, 2014.
- CARVALHO, B.F. et al. Occurrence of mycotoxins and yeasts and molds identification in corn silages in tropical climate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 1181-1192, 2016.
- CHAUHAN, R. et al. Recent advances in mycotoxins detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 81, p. 532-545, 2016.
- CHELI, F., CAMPAGNOLI A., DELL'ORTO, V. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. **Animal Feed Science and Technology**, 183, pag 1– 16, 2013.
- DÄNICKE, S. et al. Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 89, pag.303–315, 2005.

- DEACON, J.W. **Fungal Biology**. Malden: Blacwell Publishing. 4. ed., p. 1-15, 2006.
- DI GREGORIO, M. C. et al. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. **Toxins Reviews**, v. 33, p. 125-135, 2014.
- DRIEHUIS, F. et al. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. **Journal of Dairy Science**. v.91, n.11, p.4261- 4271, 2008.
- DRIEHUIS, F.; Occurrence of mycotoxins in silage In: II International Symposium on Forage Quality and Conservation: 2., São Pedro, 2011. **Proceeding...** Piracicaba: FEALQ, p.85 -103, 2011.
- DRIEHUIS, F. et al. Silage review: Animal and human health risks from silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.
- DUNIÈRE, L. et al. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. **Animal Feed Science and Technology**, 182:1-15, 2013.
- EUROPEAN COMMISSION. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC). Off. J. L 229:7–9. 2006.
- EVANGELISTA, A. R.; LIMA, J.A. **Silagens do cultivo ao silo**. Lavras: UFLA. p. 05-23, 2000.
- FOX, L.M.; HOWLETT, B. Secondary metabolism: Regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**.v.11, p.481-487, 2008.
- GALLO, A. et al. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. **Toxins**, v. 7, p. 3057-3111, 2015.
- GALLO, A. et al. Effect of inoculation with *Lactobacillus buchneri* LB1819 and *Lactobacillus lactis* O224 on fermentation and mycotoxin production in maize silage compacted at different densities. **Animal Feed Science and Technology**, v. 246, p.36-45, 2018.
- GARON, D. et al. Mycoflora and multimycotoxin detection in maize silage: Experimental study. **J.Agric. Food Chem**. 54, 3479–3484, 2006.
- GRANADA, G., ROSA, V., ZAMBIAZI, R., KOETZ, P. Caracterização de granolas comerciais. **Ciênc.Tecnol.Aliment.**, Campinas, 23(1): 87-91, jan.-abr. 2003.
- GREMMELS, J. F. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **The Veterinary Journal**, 176, pag. 84–92, 2008.
- GUIMARÃES, I. C. O., PEREIRA, J., CORNÉLIO, V.M.O., BATISTA, L.R., EVANGELISTA, R.M., FERREIRA, E.B. Comparação de metodologias para detecção de fungos em arroz irradiado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 69, n. 2, p. 194-200, 2010.

HERRMANN, C.; IDLER, C.; HEIERMANN, M. Improving aerobic stability and biogas production of maize silage using silage additives. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 393-403, 2015.

Jl, C.; FAN, Y.; ZHAO, L. Review on biological degradation of mycotoxins. **Animal Nutrition**, p. 127-133, 2016.

KHAN, N. A. et al. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 95, n. 2, p. 238-252, Jan. 2015.

KHANAFARI, A.; SOUDI, H.; MIRABOULFATHI, M. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production in corn. **Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.**, v.4, n.3, p. 163-168 2007.

MA, Z.X. et al. The capacity of silage inoculant bacteria to bind aflatoxin B1 in vitro and in artificially contaminated corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, 2017.

MAGAN, N., ALDRED, D. Why do fungi produce mycotoxins? In: **Food Mycology. A Multifaceted Approach to Fungi and Food**, vol 25, p. 121-134. New York: CRC Press, 2007.

MAGAN, N.; MEDINA, A.; ALDRED, D. Possible climate-change effects on mycotoxin contaminant of food crops pre and postharvest. **Plant Pathology**. Oxford, v. 60, n. 1, p. 150-163, Feb. 2011.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218–237, 2013.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39:183–191, 2010.

MUCK, R.E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v, 101, n. 5, 2018.

NUSSIO, L.G., CAMPOS, F.P., DIAS, F.N. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS. **Anais...**Maringá: UEM, p. 127-145, 2001.

O'BRIEN M.; O'KIELY P.; FORRISTAL P. D.; FULLER H. T. Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands, **FEMS Microbiology Letters**, 247, 131-135, 2005.

O'BRIEN M., O'KIELY P., FORRISTAL, P.D., FULLER, H.T. Fungal contamination of big-bale grass silage on Irish farms: predominant mold and yeast species and features of bales and silage. **Grass and Forage Science**, 63, 121-137, 2008.

OGUNADE, I. M. et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and bacterial diversity in corn silage contaminated with the pathogen and treated with chemical or microbial additives. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.3, 2017.

OGUNADE, I. M. et al. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.

OLIVEIRA, I.L. et al. Nutritive value of corn silage from intensive dairy farms in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 46 (6): 494-501, 2017.

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

OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHAL, J.C. Silage fermentation processes and their manipulation. In: Fao Eletronic Conference on Tropical Silage, 1999, Rome. Silage making in the tropics with emphasis on smallholders. **Proceedings**. Rome: FAO, p.17-30, 2000.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: **Silage Science and Technology**. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison (eds). ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, v. 42, p. 31-93, 2003.

PATRIARCA, A.; PINTO, V.F. Prevalence of mycotoxins in food and decontamination. **Current Opinion in Food Science**, v.14, p. 50-60, 2017.

PEREYRA, M.L.G. et al. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 04, 1034-1041, 2008.

QUEIROZ, O. C. M. et al. Silage review: Foodborn pathogens in silage and their mitigation by silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.

REVERBERI, M. et al. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied Microbiol Biotechnology**, 87, 899–911, 2010.

RODRÍGUEZ, A. et al. Detection of filamentous fungi in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 36–42, 2015.

SANTOS, A.O.; ÁVILA, C.L.S.; SCHWAN, R.F. Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. **J Dairy Sci** 96, 7777–7789, 2013.

SCHMIDT, P. et al. Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: A farm survey using infrared thermography. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, 2015.

SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 48-55, 2006.

SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F.; REIS, R. A. Instabilidade aeróbia de silagens: efeitos e possibilidades de prevenção. In: REIS, R. A.; SIQUEIRA, G. R.; BERTIPAGLIA, L. M. A. (Ed.). **Volúmosos na produção de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 25-60, 2005.

SIQUEIRA, G.R.; BERNARDES, T.F. Culturas destinadas à ensilagem. In: REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. (Ed.) **Forragicultura, Ciência tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. Jaboticabal, SP: Maria de Lurdes Brandel., p.661-670, 2013.

SIQUEIRA, G.R. Aditivos associados à ensilagem. In: REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. (Ed.) **Forragicultura, Ciência tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. Jaboticabal, SP: Maria de Lurdes Brandel., p.689-698, 2013.

SOUZA, D.R. et al. Efeitos tóxicos dos fungos nos alimentos. **Revinter**, v. 10, nº 02, p. 73-84, 2017.

SPADARO, D. et al. Evolution of fungal populations in corn silage conserved under polyethylene or biodegradable films. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p.510-520, 2015.

STORM, I. M. L. D., RASMUSSEN, R. R., RASMUSSEN, P. H. Occurrence of Pre- and Post-Harvest Mycotoxins and Other Secondary Metabolites in Danish Maize Silage. **Toxins**, 6, pag.2256-2269, 2014.

TAPIA, M., STERN, M., KOSKI, T., BACH, A., MURPHY, M. Effects of patulin on rumen microbial fermentation in continuous culture fermenters. **Animal Feed Science and Technology** 97, pag.239–246, 2002.

UEGAKI, R.; TSUKIBOSHI, T.; TOHNO, M. Changes in the concentration of fumonisin, deoxynivalenol and zearalenone in corn silage during ensilage. **Animal Science Journal**, v. 84, p. 656-662, 2013.

VERHEECKE, C.; LIBOZ, T.; MATHIEU, F. Microbial degradation of aflatoxin B1: Current status and future advances. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p. 1-9, 2016.

WAMBACQ, E., VANHOUTTE, I., AUDENAERT, K., DE GELDER, L., HAESAERT, G. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: a review. **J Sci Food Agric.**, 96, pag. 2284–2302, 2016.

WU, F.; GROOPMAN, J.D.; PESTKA, J.J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.**, v. 5, p. 351-372, 2014.

XU, D. et al. Modulation of Metabolome and Bacterial Community in Whole Crop Corn Silage by Inoculating Homofermentative *Lactobacillus plantarum* and Heterofermentative *Lactobacillus buchneri*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2019.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L.G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.170-189, 2009.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO: DIVERSIDADE DE FUNGOS EM SILAGENS DE MILHO INOCULADAS COM *Lactobacillus buchneri* (CCMA1366) OU *Lactobacillus farraginis* (CCMA1362)

RESUMO

Um grande desafio na produção de silagem de milho é evitar a deterioração aeróbia, principalmente por fungos filamentosos e leveduras. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito das cepas epifíticas *Lactobacillus buchneri* (CCMA 1366) e *Lactobacillus farraginis* (CCMA 1362) na composição química e microbiana fúngica de silagens de milho e em amostras dessas silagens após 24 horas de exposição aeróbica. Três tratamentos foram utilizados: I) Controle: Silagem de milho sem inoculação; II) Silagem de milho inoculada com *L. buchneri*; III) Silagem de milho inoculada com *L. farraginis*. As silagens foram estocadas por 29, 103 e 193 dias e foram analisadas quanto às populações e espécies de leveduras e fungos filamentosos, MS, pH, atividade de água (a_w) e produtos da fermentação. Para análise dos dados a função *fat2.dic* do pacote *ExpDes.pt* do programa estatístico R foi utilizada. Dois contrastes foram testados comparando: I) CON vs. *L. buchneri*, II) CON vs. *L. farraginis*. Significância foi declarada com $P < 0,05$. Gráficos de análise descritiva foram feitos para as contagens microbianas utilizando o pacote *ggplot2* do programa estatístico R. Todas as silagens apresentaram pH adequado. As silagens inoculadas apresentaram maior concentração de ácido acético e 1,2 - propanodiol comparadas ao controle. Cinco espécies de leveduras foram encontradas na forragem. *Candida glabrata* foi isolada das silagens controle e *L. buchneri*. Nenhuma levedura foi isolada da silagem inoculada com *L. farraginis*. Houve predominância da espécie *A. fumigatus* no tempo 103 dias. Espécies dos gêneros *Fusarium*, *Phoma*, e *Beauveria* foram isoladas da planta fresca. *Monascus* e a espécie *Aspergillus flavus* foram isolados nos tempos 29 e 103 dias, respectivamente. A inoculação das cepas avaliadas modificou positivamente a composição química e microbiana fúngica das silagens.

Palavras-chave: Milho. Inoculante. Fungos filamentosos. Leveduras. Exposição aeróbia.

ABSTRACT

A major challenge when producing corn silage is to avoid aerobic deterioration, mainly by filamentous fungi and yeasts. The objective of the study was to evaluate the effect of the epiphytic strains *Lactobacillus buchneri* (CCMA 1366) and *Lactobacillus farraginis* (CCMA 1362) in the chemical and fungal composition of whole plant corn silages and in samples of these silages after 24 hours of aerobic exposure. Three treatments were used: I) Control (CON): Corn silage without inoculation; II) Corn silage inoculated with *L. buchneri*; III) Corn silage inoculated with *L. farraginis*. The silages were stored for 29, 103 and 193 days and analyzed for fungal microbial populations, DM, pH, water activity (a_w) and fermentation products. For data analysis, the `fat2.dic` function of the `ExpDes.pt` package of the statistical program R was used. Two contrasts were tested comparing: I) CON vs. *L. buchneri*, II) CON vs. *L. farraginis*. Significance was declared with $P < 0.05$. Descriptive analysis charts were made for the microbial counts using the `ggplot2` package of the statistical program R. All silages presented adequate pH. The inoculated silages had a higher concentration of acetic acid and 1,2 - propanediol compared to the control. Five yeast species were found in the fresh plant. *Candida glabrata* was isolated from the control and *L. buchneri* silages. No growth of yeasts was observed in the *L. farraginis* silage. The highest count of filamentous fungi was observed in time 103 days where *Aspergillus fumigatus* was predominant. Species of the genus *Fusarium*, *Phoma* and *Beauveria* were isolated from the fresh plant. *Monascus* and the species *Aspergillus flavus* were also isolated from the 29 and 103 days, respectively. Inoculation of the evaluated strains modified positively the chemical and fungal composition of the silages.

Key words: Corn. Inoculant. Filamentous fungi. Yeasts. Aerobic exposure.

1. INTRODUÇÃO

Um desafio na produção de silagem de milho está relacionado a sua suscetibilidade à deterioração aeróbia. Esse processo é iniciado por microrganismos indesejáveis como leveduras e fungos filamentosos e pode ser ainda mais intensificado em regiões de clima tropical, onde o clima quente e úmido propicia condições ideais para o crescimento dos mesmos (BERNARDES et al., 2018; DRIEHUIS et al., 2018).

O crescimento fúngico resulta em perdas de MS, redução da qualidade nutricional, possível contaminação com micotoxinas e redução do desempenho animal (BORREANI et al., 2018; MUCK et al., 2018). Fungos dos gêneros *Fusarium*, *Alternaria* e *Aspergillus* são comumente associados com contaminações no campo (CHELI et al., 2013). Já no período de armazenamento espécies como *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Aspergillus fumigatus*, *Monascus ruber*, entre outros podem se desenvolver em silagens mal manejadas (DRIEHUIS et al., 2018).

Um fator ainda mais agravante associado à contaminação fúngica é a produção de metabólitos secundários, como as micotoxinas. Gallo et al. (2015) revisaram resultados de estudos *in vivo*, e verificaram que dentre os vários efeitos maléficos que as micotoxinas podem ocasionar aos animais, estão a redução na motilidade do rúmen, inibição de crescimento, redução da eficiência reprodutiva, redução da produção de leite, lesão hepática, imunossupressão, dificuldade de locomoção, entre outros. Os principais gêneros envolvidos na produção de micotoxinas são *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (BENETT & KLICK, 2003). As principais micotoxinas relacionadas com a presença desses gêneros na silagem, são as aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas, tricotecenos, ácido micofenólico e roquefortinas (OGUNADE et al., 2018).

A melhor forma de se evitar a produção de micotoxinas em silagens é inibindo o crescimento dos fungos que as produzem. A inibição do crescimento de fungos em silagens ocorre devido ao estabelecimento das condições anaeróbicas, abaixamento do pH e também em função da produção de ácido fracos, como o ácido acético, com propriedades antifúngicas (MUCK et al., 2010; OGUNADE et al., 2018). Nesse contexto o uso de inoculantes na ensilagem de milho é realizada com o objetivo de minimizar as perdas fermentativas, as perdas decorrentes da deterioração aeróbia e assim melhorar a qualidade da silagem. Quando um inoculante é efetivo, pode atuar

inibindo o crescimento de fungos filamentosos e assim reduzindo seus efeitos negativos. As bactérias do ácido lático (BAL) heterofermentativas obrigatórias são as mais utilizadas e mais estudadas para ensilagem de milho (BLAJMAN et al., 2018) com o objetivo de inibir fungos, pois produzem, além do ácido lático, o ácido acético que apresenta efeitos antifúngicos (MUCK et al., 2018).

Muitas pesquisas focam seus estudos no desenvolvimento de inoculantes microbianos (CARVALHO et al., 2017; KESHRI et al., 2018; REIS et al., 2018; SANTOS et al., 2016; WANG et al., 2018). Apesar da espécie *L. buchneri* ser amplamente utilizada e pesquisada, novos estudos em nível de cepas são necessários, pois cepas da mesma espécie podem apresentar diferentes resultados quando inoculadas na silagem (ÁVILA et al., 2009; SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2016; REIS et al., 2018). O gênero *Lactobacillus* é organizado em quatro grupos e a espécie *L. farraginis* é uma espécie pertencente ao grupo *L. buchneri* e apresenta metabolismo heterofermentativo com produção de ácido a partir de glicose, frutose, galactose, arabinose, entre outros (ENDO & OKADA, 2007; MUCK et al., 2018). A espécie também é capaz de crescer em faixas de temperatura e pH entre 15 e 45°C e 4.0 e 8.5, respectivamente (ENDO & OKADA, 2007).

As cepas utilizadas nesse experimento foram selecionadas para serem utilizadas em silagens de milho, dentre outras características apresentaram bom crescimento no extrato de milho e capacidade de inibir o crescimento de fungos filamentosos comumente encontrados na silagem de milho, como *A. flavus* e *A. parasiticus*, além de leveduras e bactérias (COSTA, 2019). Ao nosso conhecimento não há estudos que investigaram a espécie *L. farraginis* como inoculante para silagem de milho de planta inteira. Além disso, conhecer a diversidade de fungos em silagens de milho inoculadas contribui para o entendimento sobre a origem da contaminação e sobre formas de evitá-la. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da inoculação das cepas epifíticas *L. buchneri* (CCMA 1366) e *L. farraginis* (CCMA 1362) na composição química e microbiana fúngica das silagens de milho de planta inteira.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Inoculantes

As cepas *Lactobacillus buchneri* (CCMA1366) e *Lactobacillus farraginis* (CCMA1362) foram utilizadas como inoculantes. Elas foram selecionadas a partir de 88 cepas previamente isoladas de silagens de milho por apresentarem características desejáveis para o uso como inoculante (COSTA, 2019). Para a seleção, além de outras características, foram observados nessas cepas o potencial inibitório de microrganismos indesejáveis comumente encontrados na silagem de milho, como *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Aspergillus flavus*. Posteriormente, as cepas que apresentaram os melhores resultados nos testes citados anteriormente foram avaliadas como inoculantes em silos experimentais. As cepas estão depositadas na Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola - CCMA, da Universidade Federal de Lavras. A reativação e preparo das mesmas foram realizados de acordo com a metodologia de Ávila et al. (2009). Durante a ensilagem 20 mL do inoculante foi diluído em 380 mL de água destilada e aplicada uniformemente em 20 kg de forragem. A população inoculada foi de 5 log UFC (Unidades formadoras de colônias) g⁻¹ e 8 log UFC g⁻¹ de forragem para as cepas *L. buchneri* e *L. farraginis*, respectivamente. No tratamento controle somente água destilada foi adicionada (400 mL). Para padronização da taxa de inoculação foi realizado um teste prévio do crescimento de ambas bactérias, porém no cultivo das duas cepas para montagem do experimento em si, o crescimento de *L. buchneri* foi mais lento, resultando nas diferentes taxas de inoculação, o que só foi possível verificar no plaqueamento realizado após a montagem do experimento.

2.2 – Ensilagem

A colheita das plantas de milho (híbrido RB9077 VT PRO Riber – KWS Sementes S.A, Brasil) foi realizada 120 dias após o plantio. As plantas foram picadas resultando em partículas com tamanho médio de 10,65 ± 3,6 mm, medida realizada de acordo com o método de Heinrichs e Kononoff (2002). As silagens foram preparadas em bombonas de 30L utilizadas como silos experimentais, onde a forragem foi compactada até atingir densidade aproximada de 701±21 kg de forragem fresca por m³. Três replicatas dos três tratamentos foram preparadas para cada tempo de estocagem: 29, 103 e 193 dias, totalizando 27 unidades experimentais. Amostras da planta fresca também foram coletadas previamente à ensilagem para serem analisadas. Os três

tratamentos foram ensilados simultaneamente, seguindo a ordem dos tempos e das repetições. O tempo gasto na montagem do experimento foi de aproximadamente três horas. Os silos foram selados, pesados e mantidos em temperatura ambiente.

2.3 – Procedimentos analíticos

Um extrato aquoso foi preparado utilizando 25 g de planta fresca e das silagens, diluídas em 225 mL de água destilada e homogeneizadas em orbital shaker por 4 minutos para medir o pH. Foi feita então, a leitura do pH para cada amostra (Digimed®DM 20 Potentiometer; Digicrom Instrumentos, SP, Brazil). Os valores de atividade de água (a_w) da planta fresca e das amostras de silagens de todos os tempos foram verificados diretamente no equipamento Aqua-Lab (Decagon Devices, Inc., USA). Foram retiradas alíquotas de 2 mL do extrato, e acidificadas com 10 μ l de H₂SO₄ 50% (v/v). Essas amostras foram congeladas para posteriores análises do conteúdo de etanol, 1,2-propanodiol e ácidos acético, propiônico e butírico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de acordo com o método de Carvalho et al. (2012).

Para avaliação e determinação dos teores de MS as amostras de silagens coletadas foram secas em estufa com ventilação forçada a 55°C durante um período de 72 horas, conforme recomendações feitas pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1990).

2.4 – Análises Microbiológicas

Foram preparadas diluições seriadas a partir de extrato aquoso utilizando água peptonada 0,1% estéril. Para enumeração e isolamento dos fungos e leveduras nas amostras da forragem fresca e silagens em cada tempo de abertura alíquotas de 0,1 mL das diluições foram plaqueadas nos meios Dichloran Rose Bengal chloranphenicol (DRBC; Difco, Becton Dickinson; Sparks, MD), Dichloran glycerol 18% (DG18; Himedia) e Batata Dextose ágar (BDA; Himedia). As placas foram incubadas a 25°C. A contagem de leveduras e fungos filamentosos foi realizada com 48 h e 5 dias, respectivamente, e os mesmos foram diferenciados pela morfologia das colônias e celular. Os resultados para as contagens foram expressos em UFC g⁻¹ conforme Samson et al. (2010).

2.5 – Avaliação da diversidade fúngica

Fungos filamentosos foram isolados de todos os meios de cultura, das amostras de silagens no momento da abertura e das silagens após 24h de exposição ao ar. As leveduras foram isoladas somente do meio DRBC, das amostras de silagem no momento da abertura dos silos. Os microrganismos foram isolados de acordo com as características morfológicas das colônias. O número de UFCs foi registrado para cada morfotipo e o valor da raiz quadrada deste número foi purificado. Fungos filamentosos foram purificados em meio ágar malte (MA; Acumedia) e leveduras em ágar YPD (Difco).

As leveduras foram caracterizadas microscopicamente quanto à forma celular e de reprodução. Para identificação morfológica dos fungos, os isolados foram repicados em meios específicos de identificação de acordo com Klich (2002), Samson et al., (2010) e Pitt & Hocking (1999). Após sete dias de incubação características macroscópicas e microscópicas foram avaliadas e utilizadas na identificação.

2.5.1 – Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis

O MALDI-TOF MS é uma técnica rápida e moderna utilizada na identificação de microrganismos com base em seus perfis de expressão de proteínas ribossomais, podendo ser então utilizada na identificação de fungos deteriorantes de alimentos (LIMA & SANTOS, 2017). As análises foram realizadas no equipamento ultrafleXtreme MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics; Bremen, Germany) equipado com 1000 Hz neodymium-doped yttrium aluminum garnet laser. Para leveduras, as amostras foram analisadas de acordo com Carvalho et al. (2016), com modificações. A solução orgânica utilizada continha 33,3% de etanol, 33,3% de acetonitrila e 33,3% de ácido trifluoroacético (TFA) 10%. Para os fungos filamentosos as análises foram realizadas de acordo com Lima & Santos (2017), com modificações. A solução orgânica utilizada foi a mesma descrita para leveduras. A identificação e agrupamento dos microrganismos foi realizada a partir dos espectros de massa gerados e analisados no Software 3.0 do MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

2.6 – Isolamento de fungos, a_w e pH das silagens após 24 horas de exposição ao ar

Para avaliação das silagens após 24 horas de exposição aeróbia, nos três tempos de estocagem, 15 kg de silagem ficaram expostos ao ar por 24 horas em bombonas plásticas, sem compactação e armazenadas em temperatura ambiente. Realizou-se medidas das variáveis pH e a_w das silagens utilizando a metodologia descrita em 2.3. Também foi realizado o isolamento dos fungos filamentosos da forma como descrito em 2.4 e 2.5. A temperatura do ambiente foi monitorada e as médias obtidas para os tempos 29, 103 e 193 dias foram 28,1°C, 20,1°C e 28,5°C, respectivamente.

2.7 – Avaliação do potencial micotoxigênico de isolados do gênero *Aspergillus* Seção *Flavi*.

A avaliação do potencial toxigênico dos isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Flavi* foi realizada utilizando o método de cromatografia em camada delgada. Os isolados foram inoculados em meio YES - Yeast Extract Sucrose (extrato de levedura 20 g; sacarose 150 g; ágar 20 g; ZnSO₄·7H₂O: 0.1 g, CuSO₄·5H₂O: 0.05 g, água destilada 1 L) e incubados por 10 dias a 25°C (Filtenborg and Frisvad, 1980). Foram utilizadas soluções padrões de aflatoxina B1, B2, G1 e G2 (Sigma-Aldrich), placas de cromatografia delgada (Merck-Silica gel 60, 20 × 20) e como fase móvel TEF - Tolueno; acetato de etilo; ácido fórmico 90% (60:30:10). Para confirmar a produção de toxina a placa foi exposta à luz UV com λ 366 nm em um Chromatovisor CAMAG (Uf-Betrachter). Os isolados foram considerados produtores caso apresentassem um fator de retenção (FR) e fluorescência na mesma cor na placa em relação aos padrões.

2.8 – Avaliação da produção de citrinina por fungos do gênero *Monascus*

Para verificar a produção de citrinina dos isolados pertencentes ao gênero *Monascus*, os mesmos foram repicados em meio ágar côco (leite de coco: 400 g; ágar: 12g; água destilada: 400 mL). As placas foram incubadas a 25°C durante 10 dias (Mohamed et al., 2013). A confirmação da produção da citrinina foi realizada em luz ultravioleta com λ 366 nm em um Chromatovisor CAMAG (Uf-Betrachter). Nesta técnica, a fluorescência verde-amarela ao redor das colônias fúngicas é considerada um indicativo da produção de citrinina.

2.9 – Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3×3) sendo 3 silagens (1 controle sem inoculante e 2 silagens inoculadas) durante três tempos de estocagem (29, 103 e 193 dias), com três repetições. A análise de variância foi realizada utilizando a função *fat2.dic* do pacote *ExpDes.pt* do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2019). O teste de médias de Dunnett foi utilizado com a função *pairw.anova* do pacote *asbio* no programa estatístico R, na qual os contrastes com $P < 0,05$ foram realizados para comparação entre as silagens e controle. Foram testados os efeitos da adição de cepas por meio dos seguintes contrastes: Silagem controle (CON) vs. silagem inoculada com *L. buchneri* e silagem controle vs. silagem inoculada com *L. farraginis*. O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para as variáveis que apresentaram diferenças significativas para o tratamento ao longo do tempo.

Os dados de concentração de MS, pH, a_w e produtos da fermentação foram analisados utilizando o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + T_j + (S \times T)_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

Em que:

μ = média geral;

S_i = efeito da silagem;

T_j = efeito de tempo de estocagem;

$(S \times T)_{ij}$ = efeito da interação entre silagem e tempo de estocagem;

ε_{ijk} = erro experimental.

Os dados de população de leveduras e fungos filamentosos não apresentaram distribuição normal para os resíduos na análise de variância, por isso foram feitos gráficos de análise descritiva com as médias das silagens ao longo do tempo. As contagens de microrganismos foram transformadas em log antes do procedimento estatístico. Para a análise descritiva utilizou o pacote *ggplot2* do programa estatístico R.

3 RESULTADOS

3.1 – Planta fresca e silagens

3.1.1 - Características microbiológicas e químicas

A Tabela 1 mostra as características microbiológicas, químicas e físicas da planta fresca. As populações de leveduras e FF foram em média 6 log UFC g⁻¹ e 4,60 log UFC g⁻¹, respectivamente.

Tabela 1. Caracterização química, física e microbiológica da planta fresca do milho.

| Variáveis | Média |
|--------------------------------------|--------|
| MS (%) | 31,40 |
| pH | 5,68 |
| a _w | 0,9914 |
| População (log UFC g ⁻¹) | |
| L-DG18 | 6,15 |
| L-BDA | 6,04 |
| L-DRBC | 5,95 |
| FF-DG18 | 4,78 |
| FF-BDA | 4,60 |
| FF-DRBC | 4,60 |

MS= Matéria seca; a_w = atividade de água; L-DG18 = Leveduras no meio DG18; L-DRBC = Leveduras no meio DRBC; L-BDA = Leveduras no meio BDA; FF-DG18 = Fungos filamentosos no meio DG18; FF-BDA = Fungos filamentosos no meio BDA; FF-DRBC = Fungos filamentosos no meio DRBC.

Na Tabela 2 são apresentados os efeitos da inoculação das BAL e dos diferentes tempos de estocagem na concentração de MS, no pH e a_w das silagens. Não houve diferença entre os tratamentos para a variável teor de MS enquanto a atividade de água, apresentou diferença ao longo do tempo de estocagem, com maior valor aos 103 dias de estocagem em relação aos 29 dias (Tabela 2). Houve interação significativa ($p < 0,01$) de silagens com o tempo de estocagem (Tabela 2) para os valores de pH. Os valores médios de pH para as silagens controle e *L. buchneri*, reduziram com o tempo e foram menores com 193 dias de estocagem. Na silagem inoculada com *L. farraginis* foi observado um aumento no pH aos 103 dias e nova redução aos 193 dias de ensilagem (Tabela 2). Avaliando o efeito dentro de cada tempo, aos 29 dias de estocagem o pH foi maior nas silagens inoculadas com *L. buchneri* em relação a silagem controle ($p = 0,01$) e nos outros tempos essas silagens foram semelhantes. Após 103 e 193 dias de

estocagem as silagens inoculadas com *L. farraginis* apresentaram maior valor de pH em relação a silagem controle (Tabela 2).

Em relação aos ácidos encontrados (Tabela 3) a concentração média de ácido acético foi maior aos 193 dias de estocagem em relação aos 29 dias e valores maiores foram encontrados nas silagens inoculadas com *L. buchneri* e *L. farraginis* em relação a silagem controle ($p = 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente). Para a variável ácido butírico (Tabela 3) houve efeito significativo apenas para o tempo de estocagem, com a maior concentração aos 193 dias (Tabela 3). A concentração de 1,2- propanodiol foi maior nas silagens inoculadas em relação a silagem controle ($p < 0,01$) (Tabela 3). Não houve efeito dos tratamentos na concentração de etanol.

Aos 29 dias de estocagem a silagem controle apresentou população média de leveduras de 4 log UFC g⁻¹, 3 log UFC g⁻¹ e 3,67 log UFC g⁻¹, nos meios DG18, BDA e DRBC, respectivamente (Figura 1, A-C). Na silagem inoculada com *L. buchneri* a população média de leveduras foi 4 log UFC g⁻¹ nos três meios aos 29 dias de estocagem (Figura 1, A-C). A população de leveduras na silagem inoculada com *L. farraginis* foi abaixo do limite de detecção (<2 log UFC g⁻¹) aos 29 dias de estocagem. Com 103 dias de estocagem a população de leveduras em todas as silagens estava abaixo do limite de detecção e assim permaneceu após 193 dias. A população de fungos filamentosos em todas as silagens foi abaixo do limite de detecção em todos os meios para todas as silagens após 29 e 193 dias de estocagem (Figura 1, D-F). Com 103 dias de estocagem a população de fungos filamentosos na silagem controle foi de 4,03 log UFC g⁻¹ no meio DG18 e 4,33 log UFC g⁻¹ nos meios BDA e DRBC. Na silagem inoculada com *L. buchneri* a contagem de fungos filamentosos foi 4 log UFC g⁻¹ em todos os meios aos 103 dias. Na silagem inoculada com *L. farraginis* a contagem dos fungos filamentosos foi 3,93 log UFC g⁻¹ no meio DG18 e 3,67 log UFC g⁻¹ nos meios BDA e DRBC (Figura 1, D-F).

Tabela 2: Efeitos da inoculação de *L. buchneri* e *L. farraginis* e de diferentes tempos de estocagem na concentração de matéria seca (MS), pH e na atividade de água (a_w).

| Variável | Tratamentos | Tempo de Estocagem ¹ | | | Média | p-valor | EPM ² | | |
|----------|----------------------|---------------------------------|---------|----------|--------|---------|------------------|--------------------|----------------|
| | | 29 | 103 | 193 | | | Silagens | Tempo de estocagem | Sil. vs. tempo |
| MS (%) | CON | 27,61 | 29,14 | 26,45 | 27,73 | 0,66 | 0,13 | 0,30 | 0,3373 |
| | <i>L. buchneri</i> | 26,98 | 28,66 | 28,65 | 28,10 | | | | |
| | <i>L. farraginis</i> | 28,27 | 28,15 | 25,62 | 27,35 | | | | |
| | Média | 27,62 | 28,65 | 26,91 | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| pH | Controle | 3,54a | 3,50a | 3,43b | 3,49 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | 0,0042 |
| | <i>L. buchneri</i> | 3,60a | 3,52b | 3,46c | 3,53 | | | | |
| | <i>L. farraginis</i> | 3,53b | 3,63a | 3,53b | 3,56 | | | | |
| | CON vs. <i>Lb.</i> | 0,01 | 0,60 | 0,17 | | | | | |
| | CON vs. <i>Lf.</i> | 0,88 | <0,01 | <0,01 | | | | | |
| | Média | 3,56 | 3,55 | 3,47 | | | | | |
| a_w | Controle | 0,9853 | 0,9893 | 0,9857 | 0,9868 | 0,19 | 0,04 | 0,77 | 0,0004 |
| | <i>L. buchneri</i> | 0,9843 | 0,9873 | 0,9860 | 0,9859 | | | | |
| | <i>L. farraginis</i> | 0,9873 | 0,9887 | 0,9877 | 0,9879 | | | | |
| | Média | 0,9857b | 0,9884a | 0,9864ab | | | | | |

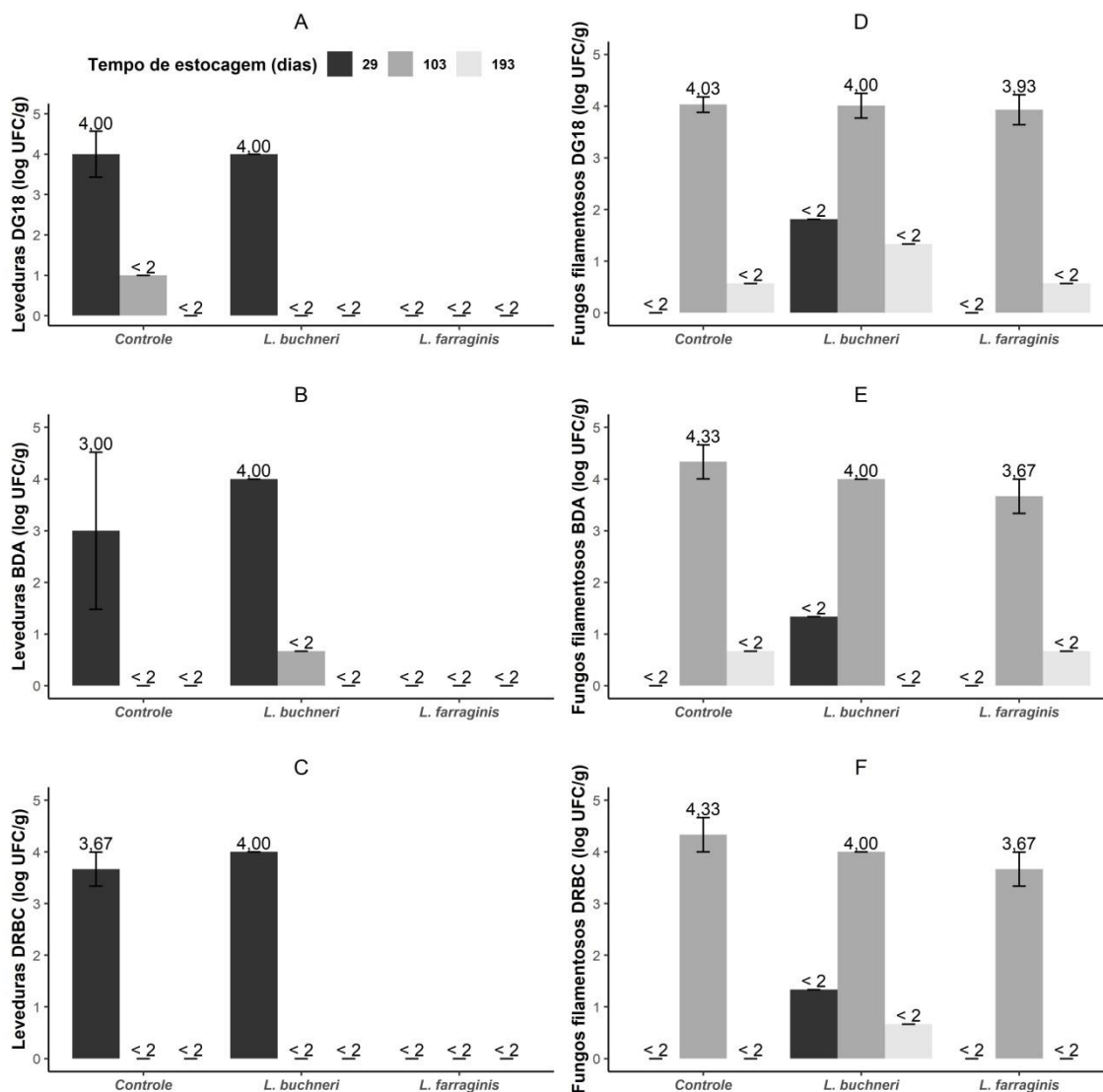
¹Médias seguidas de letras distintas nas linhas são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ²EPM = Erro padrão da média.

Tabela 3: Efeitos da inoculação de *L. buchneri* e *L. farraginis* e de diferentes tempos de estocagem nas concentrações de ácido acético, ácido butírico, 1,2 – propanodiol e etanol.

| Variável | Tratamentos | Tempo de Estocagem ¹ | | | Média | p-valor | | | EPM ² |
|---------------------------|--|---------------------------------|--------|-------|-------|----------|--------------------|----------------|------------------|
| | | 29 | 103 | 193 | | Silagens | Tempo de estocagem | Sil. Vs. tempo | |
| Ácido acético (% da MS) | CON | 0,51 | 0,91 | 0,97 | 0,79 | <0,01 | 0,01 | 0,2180 | 0,0370 |
| | <i>L. buchneri</i> | 1,12 | 0,97 | 1,32 | 1,14 | | | | |
| | <i>L. farraginis</i> | 1,81 | 2,02 | 2,08 | 1,97 | | | | |
| | Média | 1,14b | 1,30ab | 1,46a | | | | | |
| | CON vs. <i>Lb.</i> CON vs. <i>Lf.</i> | | | | | | | | |
| Ácido butírico (% da MS) | Controle | 0,00 | 0,04 | 0,29 | 0,10 | 0,8704 | <0,01 | 0,9878 | 0,0095 |
| | <i>L. buchneri</i> | 0,00 | 0,05 | 0,31 | 0,12 | | | | |
| | <i>L. farraginis</i> | 0,01 | 0,05 | 0,29 | 0,11 | | | | |
| | Média | 0,00b | 0,05b | 0,29a | | | | | |
| | CON vs. <i>Lb.</i> CON vs. <i>Lf.</i> | | | | | | | | |
| 1,2-propanodiol (% da MS) | Controle | 0,00 | 0,05 | 0,01 | 0,03 | <0,01 | 0,5393 | 0,2519 | 0,0239 |
| | <i>L. buchneri</i> | 0,17 | 0,24 | 0,42 | 0,27 | | | | |
| | <i>L. farraginis</i> | 0,66 | 0,62 | 0,60 | 0,63 | | | | |
| | Média | 0,28 | 0,30 | 0,34 | | | | | |
| | CON vs. <i>Lb.</i> CON vs. <i>Lf.</i> | | | | | | | | |
| Etanol (% da MS) | Controle | 1,53 | 1,54 | 1,54 | 1,54 | 0,2597 | 0,2274 | 0,1674 | 0,0326 |
| | <i>L. buchneri</i> | 1,92 | 1,60 | 1,49 | 1,67 | | | | |
| | <i>L. farraginis</i> | 1,59 | 1,55 | 1,62 | 1,58 | | | | |
| | Média | 1,68 | 1,56 | 1,55 | | | | | |

¹Médias seguidas de letras distintas nas linhas são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (P < 0,05); ²EPM = Erro padrão da média.

Figura 1: Populações de leveduras (A, B e C) e fungos filamentosos (D, E e F) nas silagens controle e inoculadas com *L. buchneri* e *L. farraginis*.



3.2 – Características das Silagens após exposição aeróbia

3.2.1 – Características microbiológicas e químicas

Nas amostras de silagens que ficaram expostas ao ar durante 24 horas houve interação significativa entre os efeitos de silagens e o tempo de estocagem em relação ao pH e atividade de água (Tabela 4).

Tabela 4: Efeitos da inoculação de *L. buchneri* e *L. farraginis* e de diferentes tempos de estocagem no pH e na atividade de água (a_w) nas silagens após 24 horas de exposição ar.

| Variáveis | Tratamentos | Tempo de estocagem (dias)* | | | Média | p-valor | | | EPM ¹ |
|----------------------|----------------------|----------------------------|---------|---------|--------|----------|--------------------|----------------|------------------|
| | | 29 | 103 | 193 | | Silagens | Tempo de estocagem | Sil. vs. tempo | |
| pH | Controle | 3,66a | 3,43b | 3,50b | 3,53 | <0,01 | <0,01 | 0,03 | 0,007662 |
| | <i>L. buchneri</i> | 3,75a | 3,52b | 3,52b | 3,59 | | | | |
| | <i>L. farraginis</i> | 3,68a | 3,56b | 3,60b | 3,61 | | | | |
| Contraste valor-p | CON vs. <i>Lb.</i> | 0,20 | <0,01 | 0,37 | | | | | |
| | CON vs. <i>Lf.</i> | 0,86 | <0,01 | <0,01 | | | | | |
| | Média | 3,69 | 3,50 | 3,54 | | | | | |
| Atividade de água | Controle | 0,9833b | 0,9883a | 0,9823b | 0,9847 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | 0,000367 |
| | <i>L. buchneri</i> | 0,9930a | 0,9890a | 0,9840b | 0,9880 | | | | |
| | <i>L. farraginis</i> | 0,9930a | 0,9890b | 0,9863b | 0,9894 | | | | |
| Contraste valor-p | CON vs. <i>Lb.</i> | 0,01 | 0,60 | 0,17 | | | | | |
| | CON vs. <i>Lf.</i> | 0,01 | 0,89 | 0,19 | | | | | |
| | Média | 0,9897 | 0,9887 | 0,9842 | | | | | |

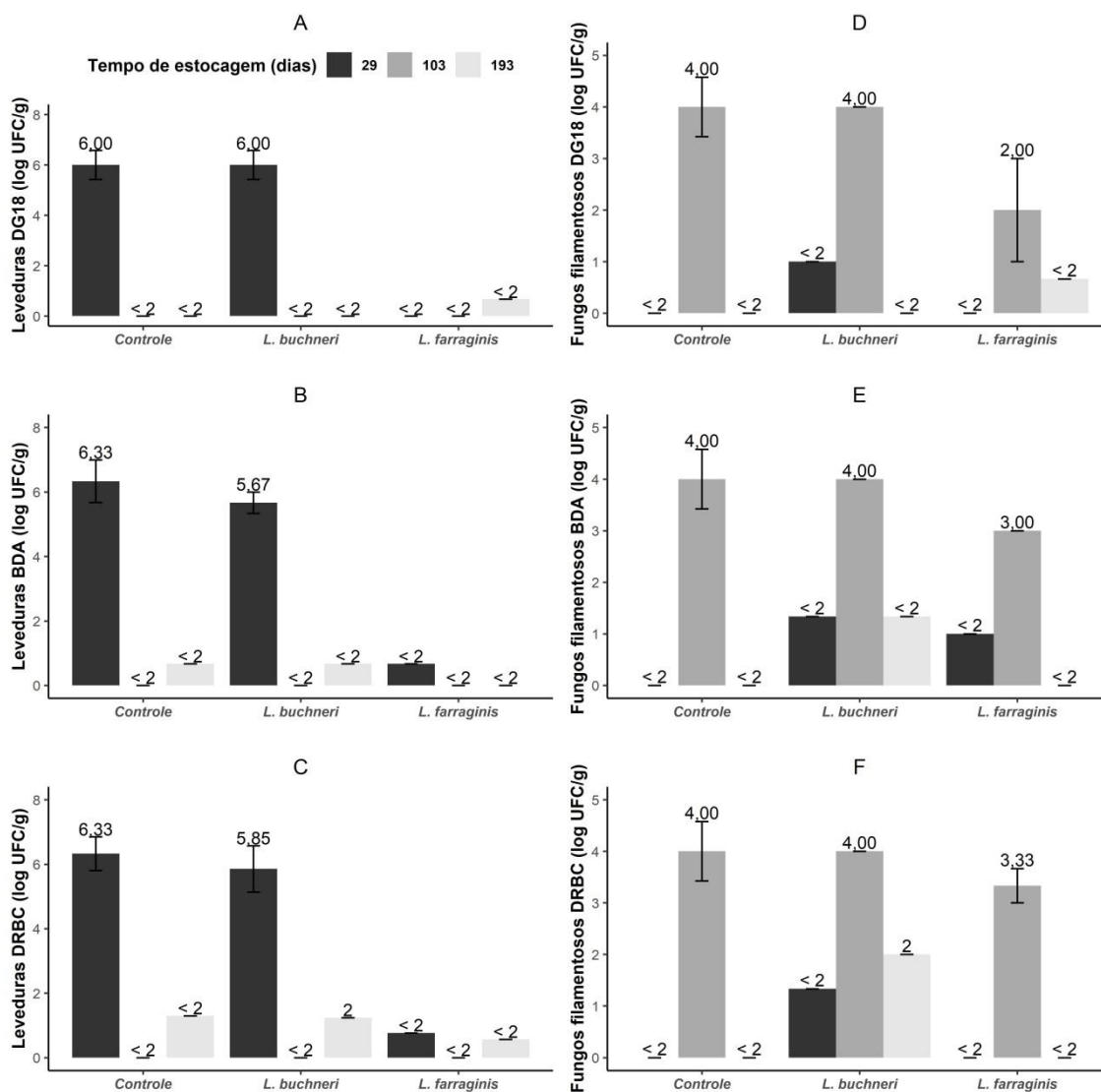
¹EPM = Erro padrão da média. *Médias seguidas de letras distintas nas linhas são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os valores médios de pH das silagens controle, *L. buchneri* e *L. farraginis* foram maiores após 29 dias em relação às avaliações com 103 e 193 dias de estocagem (Tabela 4). Aos 29 dias de estocagem não houve diferença nos valores de pH das silagens inoculadas com *L. buchneri* e *L. farraginis* em relação a silagem controle ($p = 0,20$ e $p = 0,86$, respectivamente). Já no tempo 103 dias obteve-se maiores valores de pH das silagens inoculadas com *L. buchneri* e *L. farraginis* em relação a silagem controle ($p < 0,01$). No tempo de estocagem de 193 dias obteve-se maiores valores de pH das silagens inoculadas com *L. farraginis* em relação a silagem controle ($p < 0,01$).

Os valores médios de atividade de água da silagem controle foram maiores no tempo 103 dias em relação aos tempos 29 e 193 dias (Tabela 4). Na silagem inoculada com *L. buchneri* a atividade de água foi maior nos tempos 29 e 103 dias de estocagem em relação ao tempo 193. Já na silagem inoculada com *L. farraginis* a atividade de água foi maior aos 29 dias em relação aos demais tempos. Avaliando o efeito dentro de cada tempo, aos 29 dias de estocagem houve maior atividade de água das silagens inoculadas com *L. buchneri* e *L. farraginis* em relação a silagem controle ($p = 0,01$ e $p = 0,01$, respectivamente). Já nos tempos 103 e 193 dias obteve-se valores de atividade de água semelhantes das silagens inoculadas em relação a silagem controle (Tabela 4).

Na Figura 2 são mostradas as populações de leveduras e fungos filamentosos nas silagens após 24 horas de exposição aeróbia. Com 29 dias de estocagem, nas silagens controle e inoculadas com *L. buchneri* as populações de leveduras nos três meios aumentaram de 2 a 3 log em comparação à população encontrada no momento da abertura (Figura 2, A-C) e foi abaixo do limite de detecção ($< 2 \log \text{ UFC g}^{-1}$) nos demais tempos (103 e 193 dias). Na silagem inoculada com *L. farraginis* e exposta 24 horas ao ar a contagem de leveduras ficou abaixo do limite de detecção em todos os tempos de estocagem (Figura 2, A-C). A população de fungos filamentosos praticamente não foi alterada após o período de exposição aeróbia nas silagens controle e *L. buchneri* permanecendo uma média de $4 \log \text{ UFC g}^{-1}$ aos 103 dias e abaixo do limite de detecção com 29 e 193 dias de estocagem (Figura 2, D-F). Na silagem inoculada com *L. farraginis* a contagem de fungos filamentosos foi $2 \log \text{ UFC g}^{-1}$, $3 \log \text{ UFC g}^{-1}$ e $3,33 \log \text{ UFC g}^{-1}$ nos meios DG18, BDA e DRBC, respectivamente, aos 103 dias de estocagem, permanecendo abaixo do limite de detecção nos demais tempos (Figura 2, D-F).

Figura 2: Populações de leveduras (A, B e C) e fungos filamentosos (D, E e F) nas silagens controle e inoculadas com *L. buchneri* e *L. farraginis* após 24 horas de exposição aeróbia.



3.3 – Identificação das leveduras e fungos filamentosos

3.3.1 – Identificação de leveduras e fungos filamentosos na planta fresca e nas silagens

Um total de 231 isolados foram obtidos, sendo 26 leveduras (isoladas do meio DRBC) (Tabela 5) e 205 isolados de fungos filamentosos (isolados dos meios DG18, BDA e DRBC) (Tabela 6). Para agrupamento e identificação dos fungos e leveduras, a

técnica MALDI-TOF MS foi utilizada e após purificação, os isolados foram agrupados de acordo com seus perfis de expressão proteica (Figuras 3-6).

Na planta fresca cinco espécies diferentes de leveduras foram identificadas. *Candida haemulonii*, *Cryptococcus flavescens*, *Hanseniaspora opuntiae* formaram um grupo distinto pelo agrupamento realizado pelo MALDI-TOF (Figura 3). Quatro isolados da espécie *Candida intermedia* apresentaram perfis de expressão proteica diferentes e ficaram em dois grupos distintos. Nas silagens após 29 dias de fermentação apenas a espécie *Ca. glabrata* foi identificada nas silagens controle e inoculadas com *L. buchneri* (Tabela 5). Um agrupamento foi formado com todos isolados de *Ca. glabrata*. Um isolado não foi identificado pelo banco de dados Biotyper 3.0 e também formou um grupo distinto. Na silagem inoculada com *L. farraginis*, não houve crescimento de leveduras.

Tabela 5: Espécies de leveduras isoladas do meio DRBC e identificadas pela técnica de MALDI-TOF MS.

| Tempo | Tratamento | Espécies Identificadas | População (Log UFC g ⁻¹) |
|-------|----------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 | Planta fresca | <i>Candida intermedia</i> (4*) | 5,55 |
| | | <i>Candida haemulonii</i> (1) | 4,94 |
| | | <i>Cryptococcus flavescens</i> (3) | 5,00 |
| | | <i>Hanseniaspora opuntiae</i> (2) | 5,25 |
| | | <i>Wickerhamomyces anomalus</i> (1) | 4,43 |
| | | Sem identificação (3) | 5,05 |
| 29 | Controle | <i>Candida glabrata</i> (6) | 3,76 |
| | <i>L.buchneri</i> | <i>Candida glabrata</i> (6) | 3,87 |
| | <i>L. farraginis</i> | - | - |

*número de isolados de cada espécie

Em relação aos fungos filamentosos as análises microbiológicas mostraram a presença de pelo menos três gêneros diferentes, entre eles *Fusarium*, *Phoma* e *Beauveria* (Tabela 6). A identificação de alguns fungos isolados não foi possível devido a presença de micélio estéril, ou seja, esses isolados não esporularam. Após 29 dias de estocagem a composição da microbiota foi alterada, sendo o gênero *Monascus* dominante com uma população média na silagem tratada com *L. buchneri* de 3.50 log UFC g⁻¹. Com 29 dias de estocagem nenhum isolado foi obtido das silagens controle e *L. farraginis*. Aos 103 dias de estocagem, as seguintes espécies do gênero *Aspergillus* foram identificadas, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. foetidus* e *A. niveus*. *Aspergillus fumigatus* foi isolado de todos os tratamentos com populações de aproximadamente 4 log UFC g⁻¹ de silagem (Tabela 6). *Aspergillus flavus* e fungos do gênero *Rhizopus*

foram encontrados tanto na silagem controle quanto na silagem inoculada com *L. buchneri*. *Aspergillus foetidus* e *A. niveus* foram isolados apenas na silagem *L. buchneri*. Com 193 dias de estocagem, *A. fumigatus* também foi isolado de todos os tratamentos, porém em populações menores de $2 \log \text{ UFC g}^{-1}$ (Tabela 6). Outros representantes do gênero *Aspergillus* também foram encontrados no tempo 193, porém a caracterização morfológica não foi suficiente para a identificação a nível de espécie. O agrupamento dos isolados obtidos na planta fresca e nas silagens pela técnica MALDI-TOF MS podem ser observados na Figura 4 e 5, respectivamente. Muitos isolados da planta fresca não puderam ser identificadas pelo banco de dados Biotyper 3.0. Três agrupamentos foram formados no dendograma. Os isolados do gênero *Phoma* foram agrupados com outros dois isolados não identificados. Um segundo grupo foi formado com isolados não identificados e dos gêneros *Fusarium* e *Beauveria*. No dendograma das silagens as espécies *A. fumigatus*, *Monascus sp.*, *A. flavus*, *Rhizopus sp.* formaram grupos distintos com alguns isolados da mesma espécies apresentando perfis de expressão proteica diferenciados e, por isso, formando mais de um grupo da mesma espécie. As espécies *A. foetidus* e *A. niveus* foram agrupadas junto à *A. fumigatus*.

Tabela 6: Espécies ou gêneros de fungos filamentosos identificados morfológicamente nas silagens ao longo dos tempos 29, 103, e 193 dias de estocagem.

| Tempo | Tratamento | Espécies Identificadas | População (Log UFC g ⁻¹) | | |
|-------|----------------------|-------------------------------|--------------------------------------|------|------|
| | | | DG18 | BDA | DRBC |
| 0 | Planta Fresca | <i>Fusarium sp.</i> | 4,85 | - | - |
| | | <i>Phoma sp.</i> | 4,30 | - | - |
| | | Sem identificação | 4.30 | 6.30 | 4.77 |
| | | <i>Beauveria sp.</i> | 4,30 | - | - |
| 29 | Controle | - | - | - | - |
| | <i>L. buchneri</i> | <i>Monascus sp.</i> | 3.51 | 3.51 | 3.50 |
| | | Sem identificação | | 2.78 | 2.60 |
| | <i>L. farraginis</i> | - | - | - | - |
| 103 | Controle | <i>Aspergillus fumigatus*</i> | 4.08 | 4.19 | 4.21 |
| | | <i>Rhizopus sp.</i> | - | 2.30 | - |
| | | <i>Aspergillus flavus</i> | 2.78 | 2.60 | - |
| | <i>L. buchneri</i> | <i>Aspergillus fumigatus*</i> | 4.45 | 4.29 | 4.27 |
| | | <i>Aspergillus foetidus</i> | - | 2.30 | - |
| | | <i>Rhizopus sp.</i> | - | 2.30 | 2.30 |
| | | <i>Aspergillus flavus*</i> | 2.30 | - | - |
| | <i>L. farraginis</i> | <i>Aspergillus niveus</i> | - | - | 2.30 |
| | | <i>Aspergillus fumigatus*</i> | 4.13 | 4.21 | 4.25 |
| | | Controle | <i>Aspergillus sp.</i> | 2.0 | - |
| 193 | <i>L. buchneri</i> | <i>Aspergillus fumigatus*</i> | - | 2.0 | - |
| | | <i>Aspergillus sp.</i> | 2.30 | - | 2.0 |
| | | <i>Aspergillus fumigatus*</i> | 2.0 | - | - |
| | <i>L. farraginis</i> | <i>Aspergillus sp.</i> | 2.0 | - | - |
| | | <i>Aspergillus fumigatus*</i> | 2.0 | - | - |

*A identificação da espécie foi confirmada pela técnica MALDI-TOF MS.

Figura 3: Dendograma derivado do agrupamento com base no perfil proteico das leveduras isoladas do meio DRBC da planta fresca e das silagens com 29 dias de estocagem.

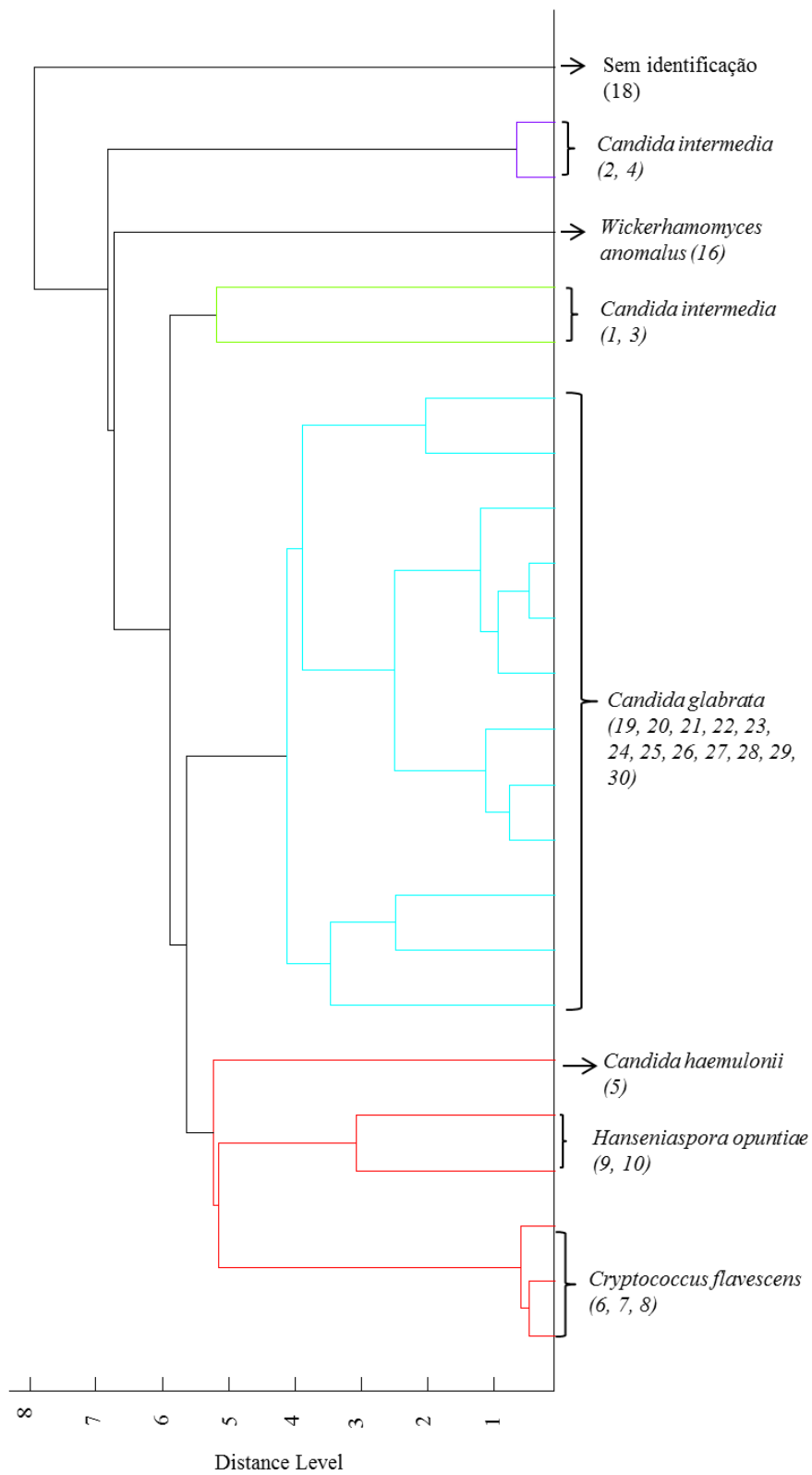


Figura 4: Dendograma derivado do agrupamento com base no perfil proteico dos fungos filamentosos isolados da planta fresca.

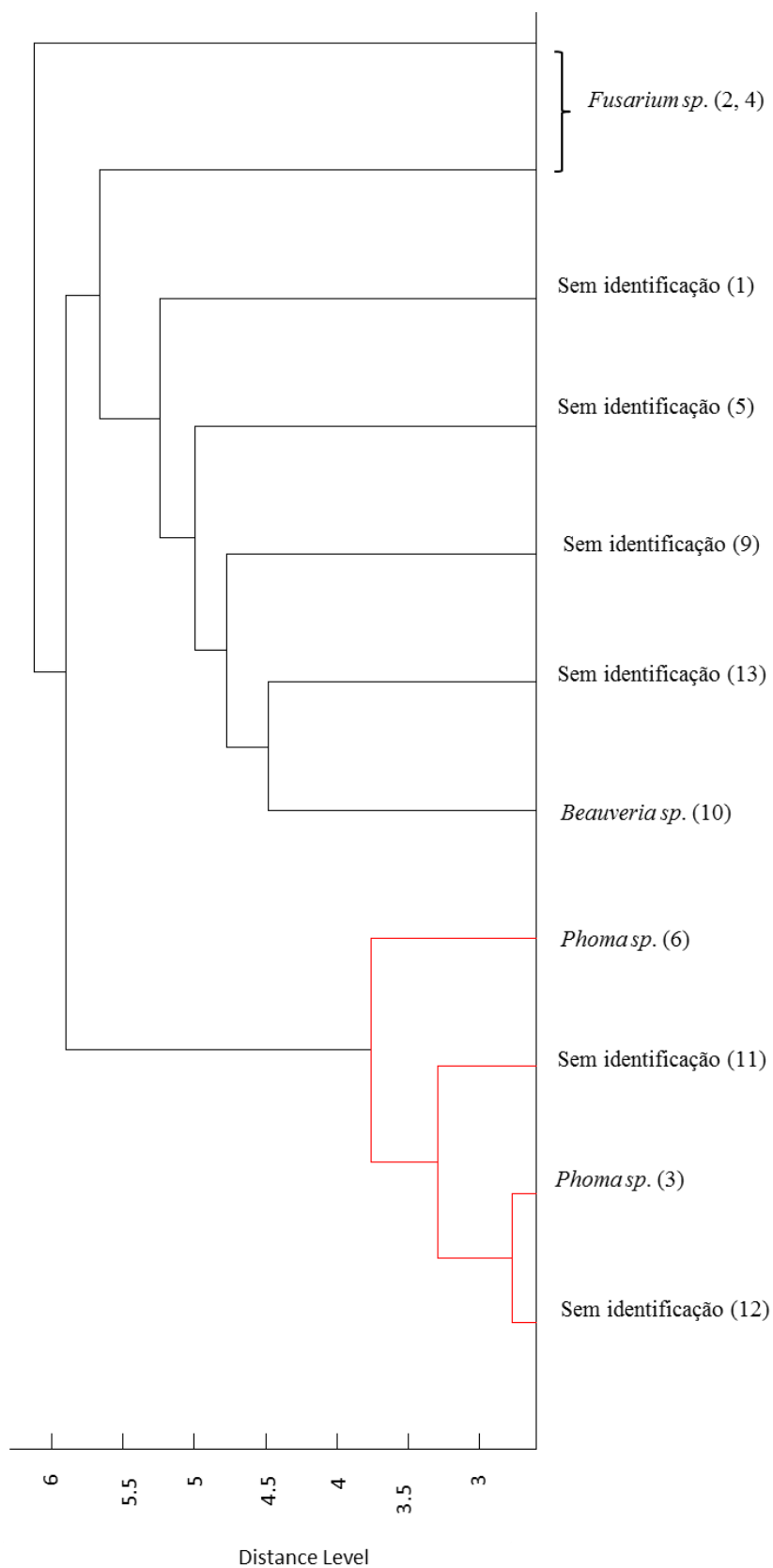
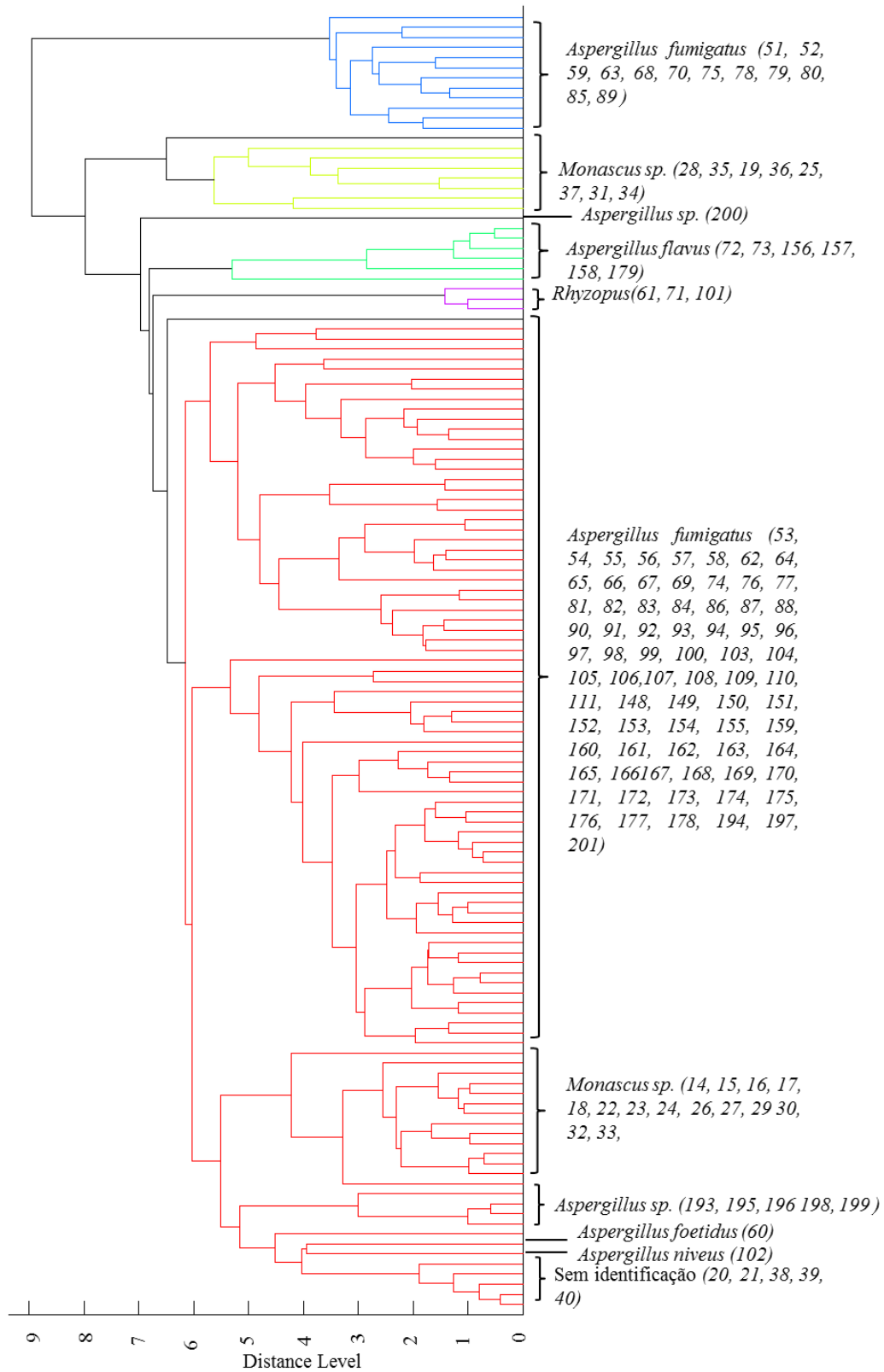


Figura 5: Dendrograma derivado do agrupamento com base no perfil proteico dos fungos filamentosos isolados das silagens após 29, 103 e 193 dias de estocagem.



3.3.2 – Identificação dos fungos filamentosos nas silagens após 24 horas de exposição aeróbia

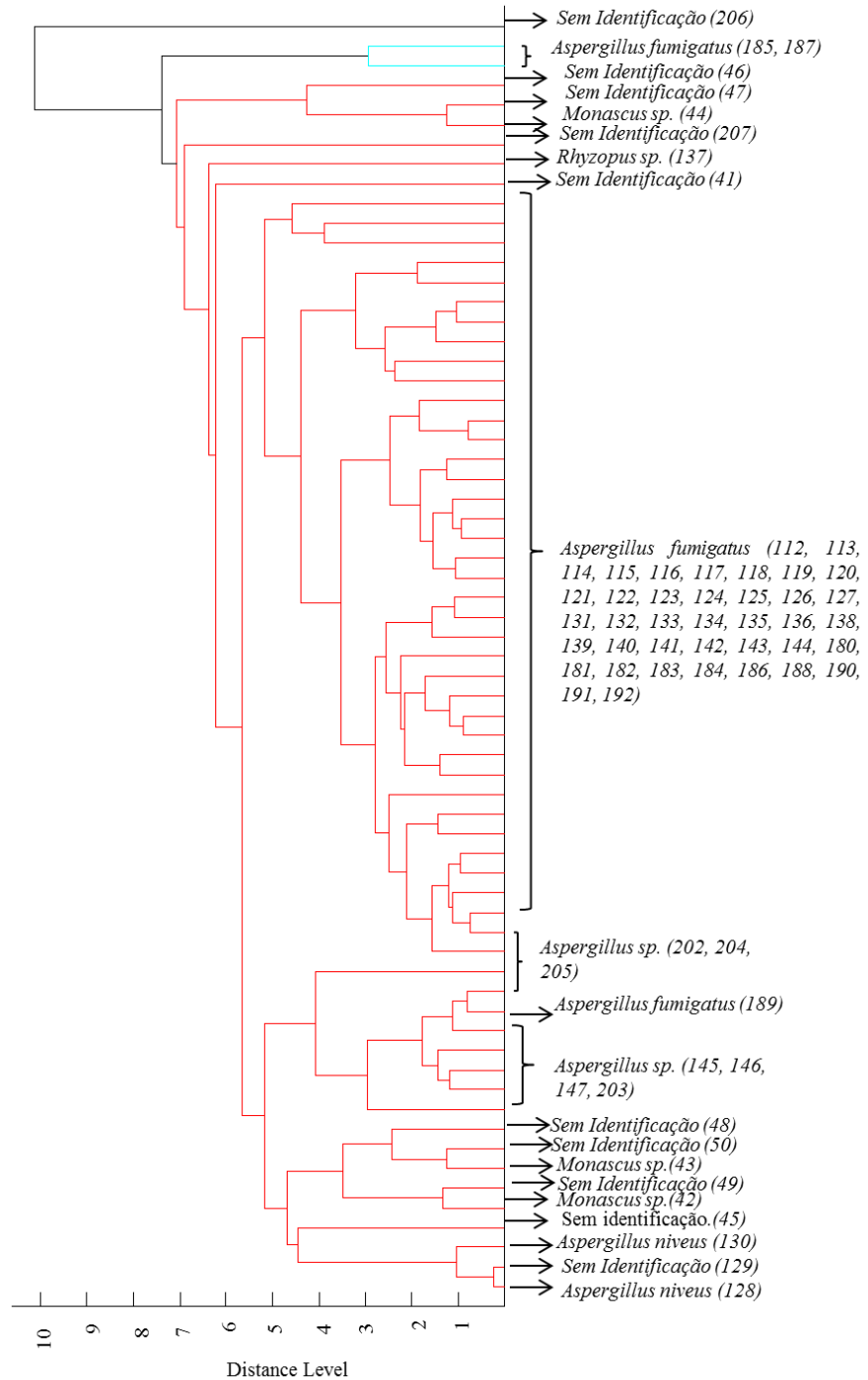
Na Tabela 7 são apresentados os resultados da identificação dos fungos filamentosos nas silagens que ficaram 24 horas expostas ao ar. Nas silagens inoculadas com *L. buchneri*, com 29 dias de estocagem foi identificado o gênero *Monascus*. Isolados não identificados, devido a presença de micélio estéril, foram isolados dessa silagem e também da silagem *L. farraginis* (Tabela 7), após 29 dias de estocagem. A espécie *A. fumigatus* foi isolada de todas as silagens estocadas por 103 dias e submetidas a exposição aeróbia. Com 193 dias de estocagem fungos não identificados foram isolados da silagem *L. farraginis*, e representantes do gênero *Aspergillus* foram isolados da silagem *L. buchneri* (Tabela 7). O agrupamento do MALDI-TOF MS das espécies identificadas nas amostras de silagem após 24 horas de exposição ao ar é apresentado na Figura 6. Um isolado (206) não identificado pelo banco de dados Biotyper 3.0 apresentou perfil de expressão diferente dos demais fungos. Um agrupamento foi formado com dois isolados da espécie *A. fumigatus* (185, 187). Os demais agrupamentos foram formados com isolados pertencentes as espécies *A. fumigatus*, *A. niveus* e os gêneros *Monascus* e *Rhizopus*

Tabela 7: Espécies ou gêneros de fungos filamentosos identificados morfologicamente nas silagens após 24 horas de exposição ao ar.

| Tempo | Tratamento | Espécies Identificadas | População (Log UFC g-1) | | |
|-------|----------------------|--------------------------------|-------------------------|------|------|
| | | | DG18 | BDA | DRBC |
| 29 | Controle | | - | - | - |
| | <i>L. buchneri</i> | <i>Monascus sp.</i> | - | - | 3.90 |
| | | Sem identificação | 3.60 | 3.90 | - |
| | <i>L. farraginis</i> | Sem identificação | - | 3.30 | - |
| 103 | Controle | <i>Aspergillus fumigatus</i> * | 3.08 | 3.34 | 3.58 |
| | <i>L. buchneri</i> | <i>Rhizopus sp.</i> | - | 2.30 | - |
| | | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 3.74 | 4.05 | 4.25 |
| | | <i>Aspergillus niveus</i> | - | - | 3.20 |
| | | <i>Aspergillus sp.</i> | - | 3.20 | - |
| | <i>L. farraginis</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 3.53 | 3.30 | 3.00 |
| 193 | Controle | | - | - | - |
| | <i>L. buchneri</i> | <i>Aspergillus sp.</i> | - | 2.30 | 2.30 |
| | <i>L. farraginis</i> | Sem identificação | 2.30 | - | - |

*A identificação da espécie foi confirmada pela técnica MALDI-TOF MS.

Figura 6: Dendograma derivado do agrupamento com base no perfil proteico dos fungos filamentosos isolados das silagens após 24 horas de exposição ao ar.



3.4 – Avaliações do potencial micotoxigênico

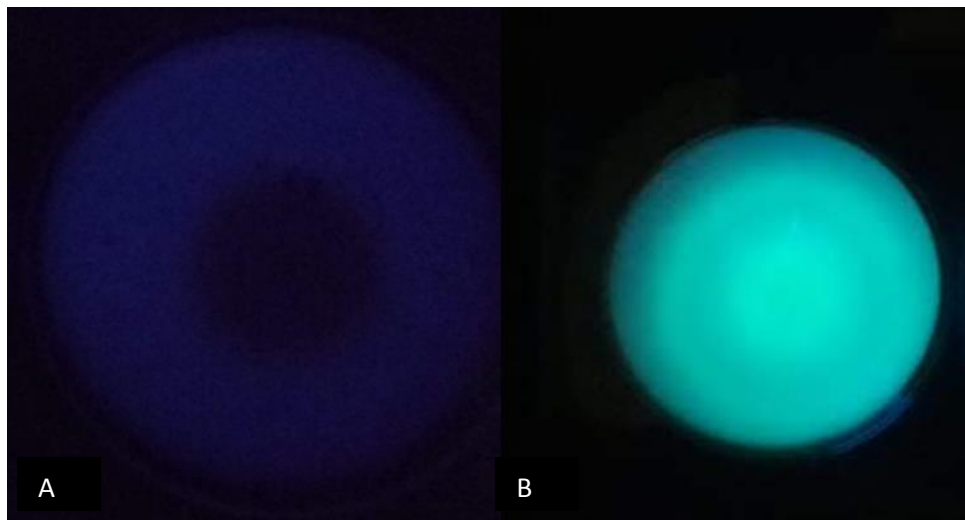
Os seis isolados identificados como *A. flavus* foram submetidos a avaliação de produção das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Nenhum deles foram considerados produtores, pois não apresentaram ponto de fluorescência na mesma altura dos padrões das micotoxinas na placa de cromatografia delgada (Figura 7).

Figura 7: Fotografia da placa, exposta à luz UV com λ 366 nm, após procedimento de cromatografia em camada delgada para confirmação da produção de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.



Os 25 isolados pertencentes ao gênero *Monascus* também foram testados em ágar côco para a produção da citrinina e nenhum deles mostrou potencial toxigênico. Não houve fluorescência em nenhuma placa (Figura 8).

Figura 8: Fotografia do reverso da colônia de um dos 25 isolados do gênero *Monascus* (A), exposta à luz UV com λ 366 nm, comparada ao controle positivo (*Penicillium citrinum*) (B) para verificação da potencial capacidade de produção de citrinina.



4 DISCUSSÃO

Leveduras e fungos filamentosos fazem parte da microbiota epifítica da planta de milho e as contagens obtidas nesse trabalho ficaram dentro da faixa normalmente encontrada (FERRERO et al., 2019; GALLO et al., 2018; SANTOS et al., 2016; WANG et al., 2018). Nossas medidas de concentração de MS indicaram que a planta de milho foi colhida com 31,40% de MS e atividade de água de 0,9914. A fermentação foi intensa e com 29 dias de estocagem, o pH atingiu valores (3,5 – 3,6) um pouco abaixo dos valores característicos de silagem de milho. Embora ainda não tenha sido realizado a análise das concentrações de ácido láctico, possivelmente esse ácido foi o principal contribuinte para o abaixamento do pH. A variável atividade de água sofreu efeito apenas do tempo de estocagem e apresentou maior valor no tempo 103 dias. Nessa abertura as silagens apresentaram contagens significativas de fungos filamentosos, o que pode justificar esse aumento sutil na a_w , pois ao oxidar os açúcares presentes, esses microrganismos produzem CO_2 e água, sendo que essa água liberada contribui então para o aumento da a_w (BORREANI & TABACCO, 2010; McDONALD et al.,

1991). Além disso, de acordo com Borreani & Tabacco, (2010) vapor de água pode ser liberado no silo nas estações frias, como o inverno, devido a diferença entre a temperatura do ambiente e o calor retido no silo. Esse fato também poderia ter contribuído para a maior a_w desse tempo, uma vez que sua abertura foi realizada no inverno, diferentemente dos outros tempos.

A atividade de água é uma medida eficaz da quantidade de água disponível para o crescimento microbiano (ALBERT et al., 1989). A atividade de água encontrada em todos os tempos não foi fator limitante para o crescimento das bactérias inoculadas e também dos fungos filamentosos e leveduras. Isso porque a maioria dos microrganismos requerem atividade de água mínima de 0,9 para crescer e os valores obtidos nas silagens corresponderam a essa condição (BROWN, 1976 apud STEVENSON et al., 2015). Maior disponibilidade de água metabólica em silagens com menor concentração de MS, pode favorecer o crescimento de BAL (KUNG et al., 2018). Entretanto, Whiter & Kung, (2001) verificaram alta osmotolerância do inoculante *L. plantarum* em silagem de alfalfa, que foi capaz de crescer em meio com a_w de 0,949.

Aos 29 dias de estocagem o pH foi maior nas silagens inoculadas com *L. buchneri* em relação a silagem controle e nos tempos 103 e 193 dias os maiores valores de pH foram observados na silagem *L. farraginis* comparada a silagem controle. O maior pH das silagens inoculadas em alguns tempos de fermentação, refletem o efeito da adição de cepas heterofermentativas que produzem além do ácido lático, ácido acético que é um ácido fraco com menor capacidade de reduzir o pH (MUCK, 2010).

A análise do perfil fermentativo das silagens mostrou que a concentração de ácido acético foi maior no tempo de estocagem 193 dias em relação aos 29 dias e valores maiores foram encontrados nas silagens inoculadas com *L. buchneri* e *L. farraginis* em relação a silagem controle. Esses resultados corroboram com a possibilidade da população de BAL epifíticas presente na silagem controle ser majoritariamente homofermentativa, enquanto que as cepas inoculadas são heterofermentativas obrigatórias.

A cepa *L. farraginis* foi eficiente em inibir o crescimento de leveduras com 29 dias de fermentação. Apesar de não ter sido observado interação significativa entre os fatores estudados, essa cepa apresentou sempre maiores valores numéricos de ácido acético, o que pode ser devido à maior população inoculada. Apesar dos menores valores numéricos de ácido acético nas silagens controle e *L. buchneri*, após 103 e 193 dias de estocagem o

crescimento de leveduras também foi inibido, indicando que outros fatores podem colaborar nesse processo. Assim, a inibição de leveduras, não deve ser considerada efeito apenas do ácido acético e sim do somatório de fatores da silagem, como, fermentação adequada e o bom manejo do silo para preservação de baixo pH e anaerobiose. Além disso, de acordo com a revisão de Kung et al. (2018), alguns trabalhos já encontraram compostos antifúngicos, além do ácido acético, em silagens inoculadas com BAL, como por exemplo, ácido benzóico e ácido salicílico. Dalié et al. (2010) também descrevem o potencial de inibição do crescimento fúngico por BAL em função da produção de compostos antifúngicos, como ácidos graxos de hidroxila, peróxido de hidrogênio e reuterina. Os autores, no entanto, discutem que essa atividade antifúngica pode ser influenciada por temperatura, pH e fatores nutricionais. Esses dados sugerem que outros modos de ação, que em conjunto com o ácido acético, podem contribuir para inibição de microrganismos indesejáveis em silagens.

A cepa *L. buchneri* produziu mais ácido acético do que o controle aos 29 dias, porém não em uma concentração suficiente para inibir as leveduras. Alguns autores tem relatado efeito mais tardio de algumas cepas de *L. buchneri* em silagens, explicado por um metabolismo lento na conversão do ácido láctico à ácido acético, sendo necessário cerca de 30 a 60 dias para esse processo se tornar evidente (MUCK et al., 2018). Schmidt et al. (2009) observaram diferenças evidentes na concentração de ácido acético em silagens de alfalfa inoculadas com *L. buchneri* apenas 45 dias após inoculação. O mesmo foi observado para as concentrações de 1,2 – propanodiol, com valores maiores nas silagens *L. buchneri* e *L. farraginis* em relação a silagem controle, o que já era esperado uma vez que o 1,2 – propanodiol é produto também da conversão do ácido láctico à ácido acético (OUDE ELFERINK et al., 2001).

A concentração de ácido butírico aumentou ao longo dos tempos de estocagem em todas as silagens, com média de 0,29 % de MS no último tempo, valor relativamente alto, pois muitos trabalhos com silagem de milho não detectam esse ácido (CARVALHO et al., 2017; FERRERO et al., 2019; WANG et al., 2018) ou detectam em concentrações menores, como no trabalho de Santos et al. (2016), onde foi detectado 0,6 g Kg⁻¹ de MS em silagens de milho inoculadas após 90 dias de fermentação. A presença de ácido butírico pode ser um indicativo do desenvolvimento de bactérias produtoras do ácido butírico, como aquelas pertencentes ao gênero *Clostridium*. O crescimento de tais bactérias é favorecido em alta atividade de água, uma vez que clostrídeos requerem uma faixa de 0,952 à 0,971 de a_w, entretanto, o crescimento

é limitado em baixos pH como no caso dos valores encontrados nas silagens (MUCK et al., 2003).

Dessa forma, uma possibilidade é que outras bactérias produtoras de ácido butírico possam ter contribuído para esses resultados, como, por exemplo, BAL presentes na população epifítica da forragem. Özcelik et al. (2016) investigaram a capacidade de produção de ácidos orgânicos por diferentes espécies de BAL e confirmaram a produção de ácido butírico em caldo MRS por espécies como *L. plantarum* e *L. acidophilus*.

Com 29 dias de estocagem os fungos filamentosos estavam em uma população muito pequena, abaixo do limite de detecção ($<2 \log \text{ UFC g}^{-1}$). Com 103 dias de estocagem, os fungos filamentosos se desenvolveram numa população significativa (aproximadamente $4 \log \text{ UFC g}^{-1}$) em todas as silagens. Com 193 dias a população reduziu novamente, indicando que a exposição prolongada às condições de anaerobiose e baixo pH limitaram o crescimento dos fungos. Uma possibilidade, pouco provável, pois os silos foram bem manejados, é da presença expressiva de fungos filamentosos no tempo 103 dias ter sido decorrente de contaminação ambiental. Isso porque a espécie *Aspergillus fumigatus* que foi isolada nesse tempo com populações também expressivas é comumente encontrada no ambiente e apresenta conídios facilmente dispersos pelo ar (KWON-CHUNG & SUGUI, 2013).

O valor do pH nas silagens após 24 horas de exposição ao ar foi numericamente maior comparado com pH das silagens no momento da abertura, com exceção das silagens controle e inoculada com *L. farraginis* aos 103 dias de estocagem. O aumento nos valores de pH observados nas silagens controle e *L. buchneri* possivelmente foi devido ao fato da contagem de leveduras ter sido maior também, como pode ser observado nas Figuras 1, A-C e 2, A-C, uma vez que esses microrganismos são os iniciadores da deterioração aeróbia através do consumo do ácido lático responsável pelo abaixamento do pH (MUCK, 2010).

As características macro e microscópicas dos fungos filamentosos foram utilizadas para identificação morfológica dos mesmos. Posteriormente à identificação morfológica, fez-se a identificação através da técnica MALDI-TOF MS para os FF e leveduras. De acordo com Lima & Santos, (2017) essa técnica apresenta potencial para contribuir para uma rápida e confiável identificação de fungos deteriorantes de alimentos.

As espécies de leveduras *Candida intermedia*, *Candida haemulonii*, *Cryptococcus flavescens*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Wickerhamomyces anomalus* foram encontradas na planta

fresca. No trabalho de Carvalho et al. (2017) com silagens de milho reidratado a espécie *Wickerhamomyces anomalus* também foi encontrada no tempo zero de estocagem. Similar aos nossos resultados, Keshri et al., (2018) também relataram uma redução na diversidade fúngica ao longo do tempo de estocagem. Nesse trabalho, também com silagem de milho de planta inteira, o gênero *Candida* apresentou abundância relativa de 70 e 45% em silagens inoculadas e não inoculadas, respectivamente, com 30 dias de ensilagem. Em nossos resultados, apenas *Candida glabrata* foi isolada nas silagens controle e *L. buchneri* com 29 dias de estocagem, porém com populações similares. A espécie *Ca. glabrata* também foi isolada da planta e da silagem de milho de planta inteira no trabalho de Wang et al. (2018). *Candida glabrata* é um patógeno oportunista de grande relevância, capaz de resistir às defesas do sistema imune de hospedeiros e causar severas infecções (SILVA et al., 2012), sendo, portanto, um microrganismo indesejável na silagem.

A diversidade de leveduras encontrada nas silagens foi baixa, diferente dos resultados obtidos por Santos et al., (2017) que encontraram mais de dez espécies de levedura em amostras de silagens de milho de fazendas dos Estados Unidos. Possivelmente, a redução da diversidade na silagem comparada à planta fresca, foi devido a rápida fermentação pelas BAL, que limitou o crescimento de espécies pouco tolerantes à acidez, anaerobiose e ácido acético considerando que esse ácido foi detectado a partir de 29 dias de estocagem.

Fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Fusarium* foram isolados da planta fresca, o que é justificável uma vez que esses esses fungos são comumente associados com infestações da cultura ainda no campo (DRIEHUIS et al., 2018). Do mesmo modo fungos do gênero *Phoma* são conhecidos por serem patógenos eficientes de culturas de importância econômica e são geograficamente disseminados (AVESKAMP, De GRUYTER, CROUS, 2008). Já os fungos do gênero *Beauveria* são patógenos de insetos com uma ampla diversidade de hospedeiros (IMOULAN et al., 2017). Por isso sua presença na planta fresca pode ter sido devido a dispersão de seus conídios por insetos infectados. Nenhum desses gêneros persistiu após a ensilagem, provavelmente por não tolerarem condições de anaerobiose e o ambiente ácido proporcionado pela fermentação eficiente das BAL.

Fungos do gênero *Monascus* foram encontrados no trabalho de Keshri et al., 2018 em silagens de milho estocadas por 90 dias. Já em nosso trabalho o gênero predominou nas silagens com 29 dias de estocagem. Os fungos *Monascus sp.* são amplamente utilizados na indústria alimentícia, pois produzem pigmentos utilizados como aditivos ou corantes, sendo

relatado inclusive propriedades antioxidantes e antimicrobianas desses compostos (AGBOYIBOR et al., 2018). Algumas espécies, como *M. ruber* e *M. Purpureus*, são capazes de co-produzir a micotoxina citrinina que apresenta efeitos nefrotóxicos, representando assim um risco para saúde animal e humana (YI HE & COX, 2016; MAGRO et al., 2016). Entretanto, em nosso trabalho os fungos identificados pertencentes a esse gênero foram testados quanto ao potencial para produção de citrinina e não foram produtores.

O gênero *Aspergillus* foi predominante a partir de 103 dias de estocagem, com a espécie *A. fumigatus* presente em todas as silagens. Spadaro et al. (2015) também encontraram *A. fumigatus* como espécie predominante após exposição aeróbia em silagem de milho de planta inteira. Carvalho et al. (2016) isolaram *A. fumigatus* de todas as amostras de silagens obtidas de seis diferentes regiões no sul do estado de Minas Gerais. A alta resistência desse fungo a fatores de estresse como baixo pH e baixa concentração de oxigênio, possibilitam que essa espécie sobreviva na silagem muito mais que outras espécies de fungos (GONZÁLEZ PEREYRA et al., 2011). Dois fatores problemáticos podem surgir a partir da presença de *A. fumigatus* em silagens e representar risco à saúde animal e humana. Primeiro é relativo ao potencial que o fungo apresenta para produção de micotoxinas como as gliotoxinas (SCHARF et al., 2012). Segundo, *Aspergillus fumigatus* apresenta notável tolerância a estresse e capacidade de invadir o sistema imune de hospedeiros, o que o torna um patógeno oportunista muito efetivo responsável por causar sérios casos de aspergilose (PAULUSSEN et al., 2016).

A espécie *Aspergillus flavus* também foi isolada das silagens controle e *L. buchneri* com 103 dias de estocagem. Apesar de estar presente em uma menor população sua presença também pode representar riscos. Algumas cepas têm a capacidade de produzir as micotoxinas aflatoxinas, que podem comprometer a segurança de produtos alimentícios de origem animal (DRIEHUIS et al., 2018). As aflatoxinas são metabolizadas pelos ruminantes no fígado e podem acabar contaminando, por exemplo, o leite, como no caso da AFB₁ que quando é consumida em altas concentrações sofre conversão para AFM₁ e pode ser encontrada nesse produto em até 12 horas (GONZÁLEZ-PEREYRA et al., 2008).

Os resultados negativos para o potencial micotoxigênico dos isolados de *Aspergillus flavus* e *Monascus sp.* devem ser avaliados com cautela e não são suficientes para confirmar a ausência de micotoxinas nas silagens. A ativação de rotas genéticas para a biossíntese de metabólitos secundários, como as micotoxinas, ocorre de forma efetiva principalmente em

condições onde há dois ou mais microrganismos interagindo (VENKATESH & KELLER, 2019). As metodologias utilizadas na avaliação de produção de micotoxinas podem ter tido algum efeito sobre os resultados, uma vez que, os isolados fúngicos, apesar de terem sido submetidos a fatores estressantes, como meio de cultura com baixa a_w , foram cultivados de forma isolada nas placas.

Além disso, a presença de fungos não confirma que há micotoxinas na silagem, e o contrário também é válido, ou seja, a ausência dos fungos não indica ausência de micotoxinas (RODRÍGUEZ et al., 2015; ZAIN, 2011). Carvalho et al. (2016) relataram a presença de micotoxinas em amostras de silagens das quais nenhum fungo foi isolado. Ao contrário dos fungos, as micotoxinas são química e termicamente estáveis e por isso resistentes aos processamentos e armazenamento de alimentos, podendo, por exemplo, permanecer e resistir às condições da ensilagem (ANFOSSI et al., 2016; OGUNADE et al., 2018).

Ademais, a ativação de genes envolvidos na biossíntese das micotoxinas respondem a diferentes estímulos ambientais e/ou condições de estresse (FOX & HOWLETT, 2008; MUCK, 2010; REVERBERI et al., 2010). Assim, a presença de genes envolvidos nas rotas metabólicas para síntese de micotoxinas não é indicativo obrigatório da produção da toxina por um fungo. Ferrero et al. (2019) analisando a presença de quatro genes envolvidos na biossíntese de aflatoxinas em isolados fúngicos de silagem de milho verificaram que, apesar de 64% dos isolados possuírem os quatro genes, apenas 43% deles produziram AF in vitro. De acordo com Ogunade et al. (2018) fatores como o pH, temperatura, atividade de água, atividade de insetos e estresse oxidativo podem predispor silagens à contaminação fúngica, e consequentemente, à possibilidade de produção de micotoxinas.

O MALDI-TOF MS foi eficaz na identificação das espécies *A. flavus* e *A. fumigatus*, que são espécies comuns em diagnósticos clínicos. A efetividade da técnica MALDI-TOF MS em aumentar a acurácia da identificação de espécies clínicas de FF foi comprovada no trabalho de Gautier et al. (2014). As demais espécies de fungos encontradas em nossas silagens não são comumente associadas a diagnósticos clínicos, o que possivelmente pode ter dificultado a identificação pelo Biotyper 3.0 Software, uma vez que apresenta banco de dados robusto para espécies clínicas. Entretanto, o MALDI-TOF MS apresentou potencial como ferramenta auxiliar para agrupamento e identificação de espécies fúngicas isoladas de silagem de milho.

Conhecer a dinâmica na diversidade fúngica durante a ensilagem de milho possibilita compreender melhor as espécies que contribuem para a deterioração aeróbia. Pesquisas como a nossa possibilitam ainda o isolamento desses microrganismos e o estudo de suas características fisiológicas, facilitando a viabilização de estratégias para aumentar a estabilidade aeróbia e, assim, melhorar a recuperação de MS, energia e nutrientes das silagens.

5 CONCLUSÃO

Fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* são indesejáveis em silagens de milho, pois afetam a qualidade nutricional e trazem prejuízos à saúde animal, principalmente se houver contaminação com micotoxinas. Assim, a inibição de fungos em silagem de milho é de suma importância e no presente trabalho foi decorrente da exposição prolongada a vários fatores da silagem e da combinação dos seus efeitos, como preservação das condições anaeróbicas, fermentação eficaz, produção de ácidos que promovam o abaixamento do pH e produção de compostos com propriedades antifúngicas. A adição das cepas *L. buchneri* (CCMA 1366) e *L. farraginis* (CCMA 1632) nas silagens possibilitou uma fermentação eficiente, com produção de ácido acético suficiente para inibir principalmente leveduras, microrganismos iniciadores da deterioração. Mais estudos são necessários para verificar se essas cepas contribuem para aumentar a estabilidade aeróbia das silagens e assim confirmar o potencial uso das mesmas como inoculantes em silagem de milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBOYIBOR C. et al. *Monascus* pigments production, composition, bioactivity and its application: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 16, p.433-447, 2018.
- ALBERT, R. A.; HUEBNER, B.; DAVIS, L. W. Role of Water Activity in the Spoilage of Alfalfa Hay. **Journal of Dairy Science**, 72, p.2573-2581, 1989.
- ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; BAGGIANI, C. Mycotoxin detection. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 120-126, 2016.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL METHODS ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analyses of the Association of Analytical Chemists**.15.ed. Arlington: [AOAC], 1117 p, 1990.
- AVESKAMP, M. M., De GRUYTER, J., CROUS, P.W. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. **Fungal diversity**, 31, p. 1-18, 2008.
- ÁVILA, C.L.S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, v.64, p.384-394, 2009.
- BENNETT, J.W., KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**,16, 497–516, 2003.
- BERNARDES, T.F. et al. Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. **Journal of Dairy Science**, v.101, n. 5, 2018.
- BLAJMAN, J.E. et al. A meta-analysis on the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v.125, p.1655-1669, 2018.
- BORREANI, G. et al. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.
- BORREANI, G.; TABACCO, E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**, v.93, n. 6, 2010.
- CARVALHO, B.F., AVILA, C.L.S., PINTO, J.C., PEREIRA, M.N., SCHWAN, R.F. Effects of propionic acid and *Lactobacillus buchneri* (UFLA SIL 72) addition on fermentative and microbiological characteristics of sugar cane silage treated with and without calcium oxide. **Grass Forage Sci** 67, 462–471, 2012.
- CARVALHO, B.F. et al. Occurrence of mycotoxins and yeasts and molds identification in corn silages in tropical climate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 1181-1192, 2016.
- CARVALHO, B. F. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**, 122, p.589-600, 2017.

CHELI, F., CAMPAGNOLI A., DELL'ORTO, V. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. **Animal Feed Science and Technology**, 183, pag 1– 16, 2013.

COSTA, D.M. **Corn silages: Development of novel inoculant and particle size on rehydrated grain**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

DALIÉ, D.K.D.; DESCHAMPS, A.M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food control**, v. 21, p. 370-380, 2010.

DRIEHUIS, F. et al. Silage review: Animal and human health risks from silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.

ENDO, A.; OKADA, S. *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57, p. 708-712, 2007.

FERRERO, F. et al. Effects of conservation period and *Lactobacillus hilgardii* inoculum on the fermentation profile and aerobic stability of whole corn and sorghum silages. **J Sci Food Agric**, 99:2530-2540, 2019.

FERRERO, F. et al. Increase in aflatoxins due to *Aspergillus* section *Flavi* multiplication during the aerobic deterioration of corn silage treated with different bacteria inocula. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 2, 2019.

FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, 13 (3), 128–130, 1980.

FOX, L.M.; HOWLETT, B. Secondary metabolism: Regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**.v.11, p.481-487, 2008.

GALLO, A. et al. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. **Toxins**, v. 7, p. 3057-3111, 2015.

GALLO, A. et al. Effect of inoculation with *Lactobacillus buchneri* LB1819 and *Lactobacillus lactis* O224 on fermentation and mycotoxin production in maize silage compacted at different densities. **Animal Feed Science and Technology**, v. 246, p.36-45, 2018.

GAUTIER, M. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. **Clin Microbiol Infect**, 20, p. 1366-1371, 2014.

GONZÁLEZ-PEREYRA, M.L. et al. Fungi and selected mycotoxins from pre- and post fermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, 1034-1041, 2008.

GONZÁLEZ PEREYRA, M. L. et al. Comparative analysis of the mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. **J Sci Food Agric**, 91: 1474-1481, 2011.

HEINRICHS, J.; KONONOFF, P. **Evaluating particle size of forages and TMRs using the New Penn State forage particle separator**. Pennsylvania: The Pennsylvania State University/Department of Dairy and Animal Science, 2002. 14p (Technical Report DAS 02-42).

IMOULAN, A. et al. Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 2017.

KESHRI, J. et al. Microbiome dynamics during ensiling of corn with and without *Lactobacillus plantarum* inoculant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.

KUNG Jr, L. et al. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.

KWON-CHUNG, K. J., SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus* – What makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 12, 2013.

LIMA, N. SANTOS, C. MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. **Current Opinion in Food Science**, p. 26-30, 2017.

MAGRO, M. et al. Citrinin mycotoxin recognition and removal by naked magnetic nanoparticles. **Food Chemistry**, 203, p. 505-512, 2016.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991.

MOHAMED, S. et al. An extension of the coconut cream agar method to screen *Penicilium citrinum* isolates for citrinin production. **Letters in Applied Microbiology**, 57, p. 214-219, 2013.

MUCK, R. E.; MOSER L. E.; PITT. R. E. **Postharvest factors affecting ensiling**. In: *Silage Science and Technology*. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, (eds). ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, v. 42, p. 251-304, 2003.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39:183–191, 2010.

MUCK, R.E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v, 101, n. 5, 2018.

OGUNADE, I. M. et al. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2 – Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 01, 2001.

ÖZCELİK, S.; KULEY, E.; ÖZOGUL, F. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. **LWT – Food Science and Technology**, v. 73, p. 536-542, 2016.

PAULUSSEN, C. et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial Biotechnology**, 10, p. 296-322, 2016.

PITT J. I.; HOCKING A. D. **Fungi and food spoilage**. Weimar: Blackie Academic & Professional; 1999.

QUEIROZ, O. C. M. et al. Silage review: Foodborn pathogens in silage and their mitigation by silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2019. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2019.

REIS, C. B. et al. Wild *Lactobacillus hilgardii* (CCMA 0170) strain modifies the fermentation profile and aerobic stability of corn silage. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 01, 2018.

REVERBERI, M. et al. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied Microbiol Biotechnology**, 87, 899–911, 2010.

RODRÍGUEZ, A. et al. Detection of filamentous fungi in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 36–42, 2015.

SAMSON, R. A. et al. **Food and Indoor Fungi**. CBS Laboratory Manual Series 2. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2010.

SANTOS, A.O.; ÁVILA, C.L.S.; SCHWAN, R.F. Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. **J Dairy Sci** 96, 7777–7789, 2013.

SANTOS, A.O. et al. Fermentative profile and bacterial diversity of corn silages inoculated with new tropical lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 120, p. 266-279, 2016.

SANTOS, M.C. et al. Identification of the major yeasts isolated from high moisture corn and corn silages in the United States using genetic and biochemical methods. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 02, 2017.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol**, v. 36, p. 288-305, 2012.

SCHARF, D.H. et al. Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 96: 467-472, 2012.

SCHMIDT, R. J.; HU, W.; MILLS, J. A.; KUNG JUNIOR, L. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, 92:5005–5010, 2009.

SPADARO, D. et al. Evolution of fungal populations in corn silage conserved under polyethylene or biodegradable films. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p.510-520, 2015.

STEVENSON, A. et al. Is there a common water-activity limit for the three domains of life? **The ISME Journal**, v. 9, p. 1333-1351, 2015.

VENKATESH, N.; KELLER, N.P. Mycotoxins in Conversation With Bacteria and Fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

WANG, M. et al. Effect of inoculants and storage temperature on the microbial, chemical and mycotoxin composition of corn silage. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 31, n. 12, 2018.

WHITER, A. G.; KUNG Jr, L. The Effect of a Dry or Liquid Application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the Fermentation of Alfalfa Silage. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 10, 2001.

YI HE; COXR. J. The molecular steps of citrinin biosynthesis in fungi. **Chemical Science**, v. 7, p. 2119-2127, 2016.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129-144, 2011.