

# Avaliação da qualidade microbiológica de silagem de milho da região de Lagoa Formosa - MG

*Evaluation of the microbiological quality of maize silage in the region of Lagoa Formosa - MG*

FERNANDA MARIA GONÇALVES

Discente do curso de Medicina Veterinária - UNIPAM

E-mail: fernandamariag@unipam.edu.br

DEUSA HELENA GONÇALVES MACHADO

Professora orientadora - UNIPAM

E-mail: deusa@unipam.edu.br

---

**Resumo:** O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de microrganismos indesejáveis em silagens de milho da região de Lagoa Formosa. As análises microbiológicas das cinco amostras de silagem foram realizadas no Laboratório de Microbiologia situado no Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM, bloco D. As amostras foram preparadas e submetidas em diluições seriadas, transferindo-se 25g de silagem, adicionando-se 225ml de água peptonada tamponada (APT), obtendo-se diluição de ( $10^{-1}$ ); em seguida, adicionaram-se 10ml dessa em frasco contendo 90ml APT, obtendo-se diluições de ( $10^{-2}$ ) e, sequentemente, de ( $10^{-3}$ ). Foram determinadas as populações de fungos, *Clostridium* spp., *Bacillus cereus*., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em plaqueamento e confirmados através de provas bioquímicas. Os resultados demonstraram que 80% das amostras apresentaram elevado crescimento fúngico e de *Listeria monocytogenes*. Foram verificadas em 40% das amostras baixa contagem de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e ausência de *Clostridium* spp. Constatou-se que as silagens de milho da região de Lagoa Formosa apresentaram uma qualidade microbiológica insatisfatória, devido à elevada presença de *Listeria monocytogenes* e fungos. Conclui-se que qualidade microbiológica está relacionada ao elevado crescimento de fungos, sendo estes mais susceptíveis à deterioração e ao crescimento de outros microrganismos indesejáveis como a *Listeria monocytogenes*, que pode infectar pessoas e animais.

**Palavras-chave:** Amostras. Microrganismos. Qualidade e silagem.

**Abstract:** The present work aimed to evaluate the presence of undesirable microorganisms in corn silage from the Lagoa Formosa region. The microbiological analyses of the five silage samples were performed in the Microbiology Laboratory in the University Center of Patos de Minas - UNIPAM. The samples were prepared and submitted to serial dilutions by transferring 25g of silage, adding 225ml of buffered peptone water (APT), and obtaining a dilution of ( $10^{-1}$ ); then, 10ml of this dilution was added to a flask containing 90ml APT, resulting in dilutions of ( $10^{-2}$ ) and, subsequently, of ( $10^{-3}$ ). The populations of fungus, *Clostridium* spp., *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* were determined by plating and confirmed by biochemical tests. The results showed that 80% of the samples had high fungal and *Listeria monocytogenes* growth. Low counts of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* and the absence of *Clostridium* spp were verified in 40% of the samples. It was found that the corn silages from the

Lagoa Formosa region presented unsatisfactory microbiological quality due to the high presence of *Listeria monocytogenes* and fungi. It is concluded that microbiological quality is related to the high growth of fungi, which are more susceptible to deterioration, and the growth of other undesirable microorganisms such as *Listeria monocytogenes*, which can infect people and animals. **Keywords:** Samples. Microorganisms. Quality and silage.

---

## 1 INTRODUÇÃO

A silagem é a forma mais antiga e tradicional de conservação de alimentos para alimentação animal, datando entre 1000 e 1500 anos a.C. pelos papiros egípcios (VIEIRA *et al.*, 2011). Trata-se da conservação de forragem verde, e o milho é o mais apto à produção de silagem (POZZA *et al.*, 2011). Porém, o fornecimento da silagem aos animais exige um armazenamento adequado (CARVALHO, 2014).

O processo de ensilagem consiste na conservação de alimentos em ambiente ácido, úmido ou parcialmente seco, de forma anaeróbica, o que causa uma depleção na respiração celular e conseqüente favorecimento da proliferação de bactérias lácticas (FRANÇA *et al.*; 2015). Essas bactérias produzem ácidos orgânicos, como o ácido lático, resultando no abaixamento do pH (MACÊDO *et al.*, 2017).

Essas características são as responsáveis pela preservação da silagem (BERNARDES, 2006), porém a produção de silagem até o produto final apresenta vários impasses que influenciam na sua qualidade química e microbiológica (BIANCHET *et al.*, 2018). Assim, a atividade microbiana pode ser dividida em duas categorias: os microrganismos desejáveis, benéficos ao processo de conservação, como as bactérias ácidas lácticas e microrganismos indesejáveis, que estão associados a perdas durante a ensilagem, ocasionadas pela deterioração anaeróbia (*Clostridium* spp.) e aeróbia (*Bacillus* spp., *Listeria* spp., leveduras e fungos filamentosos) (MACÊDO *et al.*, 2017).

A qualidade da silagem pode ser afetada pelo desenvolvimento de leveduras (iniciam o processo de degradação aeróbia, provocam a elevação do pH), além do desenvolvimento de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, e bactérias indesejáveis, com *Clostridium* spp., *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, que, quando presentes na alimentação animal, podem ser prejudiciais à saúde dos animais (VIVAS *et al.*, 2013).

Sendo assim, o emprego de boas práticas de ensilagem é fundamental para o sucesso do processo, no entanto, a microbiota da silagem exerce grande influência sobre a qualidade do processo de conservação da forragem e pode influenciar em aspectos relacionados à sanidade da silagem para o rebanho (BERNARDES, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica quanto à presença de microrganismos indesejáveis em silagens de milho da região de Lagoa Formosa. A identificação dos microrganismos envolvidos no processo de ensilagem é de fundamental importância para se conhecer a qualidade das silagens produzidas na região de Lagoa Formosa e, dessa forma, propor melhorias para a cadeia de produção de leite da região.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A silagem é a forma mais antiga, tradicional e viável de conservação de alimentos para alimentação animal. Tratando-se de conservação de forrageiras úmidas, o milho é a forrageira mais tradicional. Tal cultura é cada vez mais recomendada entre as várias plantas aptas à produção de silagem, sendo a de maior expressão no Brasil (VIEIRA *et al.*, 2011).

O processo de ensilagem pode ser dividido em quatro fases. A fase aeróbia tem poucas horas de duração; nela, ocorre a redução do oxigênio atmosférico pela respiração do material ensilado em conjunto com a atuação de micro-organismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, como leveduras e enterobactérias (SANTOS, 2012). A segunda fase é a fermentação, e tem início com a proliferação das bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) heterofermentativas e com as bactérias produtoras de ácido acético (enterobactérias) (MOMBACH, 2014).

Soma-se a isso a terceira fase, que corresponde à fase de estabilidade. Caso não ocorra entrada de ar no silo, o material não sofrerá mudanças significativas. Os baixos valores de pH fazem com que a atividade das bactérias anaeróbias seja reduzida, além de micro-organismos ácidos tolerantes que sobrevivem a esta fase em estado de inatividade ou na forma de esporos (SANTOS, 2012). Na última fase, fase de descarga, ocorre a abertura do silo e, em geral, acontece após a estabilização do material ensilado. Para algumas culturas como o milho e sorgo, o tempo de estabilização ocorre em média por volta dos 21 dias após a ensilagem, porém adota-se uma média de 30 dias para todas as culturas (MOMBACH, 2014). O último estágio dessa fase inclui a atividade de micro-organismos aeróbios deterioradores, como fungos e enterobactérias (SANTOS, 2012).

Durante o processo de fermentação, vários ácidos são produzidos, como o láctico, acético, butírico, isobutírico, propiônico, valérico, isovalérico, succínico e fórmico. Porém, os principais ácidos identificados nas silagens são o acético, o butírico e o láctico. O ácido láctico é o principal responsável por esse processo uma vez apresenta menor constante de dissociação (3,86) que os demais (MOMBACH, 2014).

Os micro-organismos desejáveis são aqueles necessários para a produção de uma boa silagem, ou seja, os produtos finais de sua fermentação são essenciais para que uma silagem de boa qualidade seja obtida. Compreendem essa classe as bactérias ácido láctico (BAL). Podem ser homofermentativas, que produzem principalmente ácido láctico, ou heterofermentativas, que produzem produtos adicionais como o etanol e ácido acético, formando CO<sub>2</sub> (NUSSIO, 2013).

No processo de ensilagem, as perdas de nutrientes podem ser evitáveis e inevitáveis. As perdas inevitáveis variam entre 7 e 10% da matéria seca, e as perdas evitáveis são, em média, 30% e são provenientes da fermentação de microrganismos indesejáveis, deterioração aeróbia durante o período de armazenamento ou após a abertura do silo (NUSSIO, 2013). As leveduras são os principais agentes responsáveis pela deterioração aeróbia das silagens. Os fungos filamentosos não são importantes em relação à fermentação da silagem, mas contribuem para as perdas na superfície do silo durante o descarregamento e em casos de vedação inadequada (JOBIM *et al.*, 2008).

Os micro-organismos indesejáveis são aqueles associados a perdas durante todas as fases do processo de ensilagem. Estão relacionados à deterioração anaeróbia,

apresentando elevado consumo de nutrientes, como *Clostrídios spp.* e *Enterobactérias*, ou à deterioração aeróbia, como leveduras, fungos filamentosos, *Bacillus spp.* e *Listeria spp.* Esses micro-organismos podem estar presentes na cultura ou ser provenientes de contaminação do solo, competindo com as BAL (SANTOS, 2012).

Os membros do gênero *Listeria spp.* são gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, e sua ocorrência em silagens tem sido associada à deterioração aeróbia, não se desenvolvendo em silagens bem preservadas (SANTOS, 2016). Seu crescimento em silagens é determinado pelo grau de anaerobiose e pH. Podem tolerar valores de pH de 3,8 a 4,2 por longos períodos se o oxigênio estiver presente, mesmo que em baixos níveis (SANTOS, 2012). A *Listeria monocytogenese* é importante em função de sua patogenicidade e capacidade de sobrevivência sob condições adversas, está associada a surtos de septicemia, abortos, doenças do sistema nervoso central e mastite, afetando, assim, muitos animais ruminantes e também o homem (SANTOS, 2016).

Os *Bacillus spp.* são Gram-positivos e anaeróbios obrigatórios ou facultativos, formadores de esporos e de importância durante a fase fermentativa. Os *Bacillus cereus* apresentam maior atividade nos estágios iniciais de fermentação e logo após a abertura do silo, quando as populações podem chegar a taxas entre  $10^2$  -  $10^6$  UFC/g de silagem (NOVINSKI, 2013).

Mombach (2014) relatou que o principal efeito desses microrganismos na silagem está relacionado ao avanço na deterioração aeróbia da silagem. Depois da atuação de leveduras e bactérias, ácido acético que elevam o pH e temperatura para valores >4,5 e em média 40 °C, respectivamente, uma segunda onda de aquecimento ocorre, aumentando as temperaturas para >50 °C, sob responsabilidade dos bacilos.

Independentemente do tipo da planta ensilada, o pH é fator determinante para o desenvolvimento de *Bacillus cereus*. As principais espécies encontradas em silagens deterioradas incluem *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. pumilus*. A presença desses agentes na silagem está relacionada com os riscos que podem causar para a saúde humana e dos animais, que são contaminados via ingestão de leite (NOVINSKI, 2013).

Os *Clostridium spp.* são bactérias gram-positivas, esporuladas, normalmente móveis e estritamente anaeróbicas, que fermentam açúcares, ácidos graxos e proteínas (SÁ NETO, 2012). Sua presença na silagem geralmente é resultado da contaminação de solo, pois, nas plantas, sua concentração é baixa (MOMBACH, 2014). Seu desenvolvimento na silagem ocorre durante o processo de fermentação e está ligado a uma lenta e insuficiente acidificação (pH 4,5), que é atribuída a uma excessiva umidade da forragem, à insuficiência de açúcares fermentescíveis e a uma considerável concentração de nitrogênio na planta (SANTOS, 2012). A concentração de amônia na silagem pode ser utilizada como um indicador do grau da atividade proteolítica do *Clostridium spp.* (SÁ NETO, 2012).

Assim, a presença de *Clostridium perfringens* em silagens está relacionada com perdas que ocorrem na fase fermentativa (NOVINSKI, 2013). O principal problema das silagens que sofreram fermentações clostrídicas é a instabilidade aeróbia, e seu uso na ração pode diminuir o consumo de matéria seca e comprometer a ecologia (MOMBACH, 2014).

Os fungos podem ser unicelulares, como as leveduras, ou colônias filamentosas multicelulares, como os mofos (SÁ NETO, 2012). São microrganismos eucariotos,

estritamente aeróbios (MOMBACH, 2014). Os principais gêneros de fungos filamentosos que têm sido isolados de silagens são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Absidea*, *Monoascus*, *Scopulariopsis* e *Trichoderma*. Seu crescimento em silagens está associado à penetração de ar, durante a fase de armazenamento, e, principalmente, durante a fase de abertura do silo (SANTOS, 2016). Segundo Horn e Novinski (2013), os fungos filamentosos presentes na silagem produzem micotoxinas. As toxinas mais encontradas nos alimentos para animais são aflatoxinas (AFLs), zearalenona (ZON) e fumonisinas (FBs). Os três fungos principais produtores das micotoxinas são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A presença dessas substâncias, além de prejudicar os animais, causa perdas econômicas (BERNARDES, 2006).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL E COLETA DAS AMOSTRAS

Trata-se de um estudo de caráter analítico e descritivo, de cunho quantitativo. A metodologia utilizada para amostragem, colheita, acondicionamento, transporte e análise microbiológica de amostras de produtos alimentícios obedeceram ao disposto pelo método ISO 11290-2:1998 amendment 1:2004.

#### 3.2 PREPARO E DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 5 amostras de silagem em frascos estéreis, a 10 cm de profundidade, em diversos pontos de silos recém-abertos, localizados na região de Lagoa Formosa no período de julho de 2021. As amostras foram identificadas e acondicionadas em recipientes isotérmicos, transportadas ao Laboratório de Microbiologia situado no Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM, bloco D.

As amostras de silagem de milho foram preparadas, alíquotas em diluições seriadas. Transferiram-se 25 ml das amostras assepticamente, adicionando-se 225 ml de diluente de água peptonada tamponada (APT), homogeneizando-se, obtendo-se a diluição ( $10^{-1}$ ). Posteriormente, adicionaram-se 10 ml dessa diluição em um frasco de erlenmeyer contendo 90 ml de APT, obtendo-se a diluição ( $10^{-2}$ ). Em seguida, da diluição ( $10^{-2}$ ), retiraram-se 10 ml e transferiu-se esse conteúdo para outro frasco contendo 90 ml de APT, obtendo-se a diluição ( $10^{-3}$ ).

#### 3.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

##### 3.3.1 Contagem de fungos filamentosos

A contagem baseou-se na inoculação das diluições seriadas das amostras, por meio da técnica de semeadura em profundidade (método de "Pour Plate"). Essa técnica é utilizada para se determinar a população de bolores e leveduras, utilizando-se o meio de cultura Ágar batata dextrose (PDA) e incubação a 27 °C, por 5 dias. A inoculação de 1 ml das três diluições da amostra foi feita em placas vazias. Adicionou-se o meio de cultura PDA e incubou-se a 25° C de 3 a 5 dias.

### 3.3.2 Contagem de *Staphylococcus aureus*

A contagem baseou-se na inoculação das diluições seriadas das amostras em placas de ágar Baird-Parker. Inoculou-se 1 ml de cada amostra na superfície de placas, contendo Baird-Parker (BP), previamente preparadas para cada diluição. Espalhou-se o inóculo com uma alça de drigalski, das placas de maior para menor diluição, até que o excesso do líquido fosse absorvido. Incubou-se a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas. A contagem foi realizada na diluição onde foi possível. As colônias típicas apresentaram-se negras, brilhantes, de forma arredondada, convexa, com bordas regulares, circundadas por dois halos, um opaco e outro transparente, constatando com o meio. As colônias atípicas apresentaram-se negras ou cinzentas, desprovidas de halo ou com apenas um.

As provas confirmatórias foram realizadas selecionando-se colônias negras, brilhantes, com anel opaco de precipitação e/ou rodeadas por halo transparente. Pescaram-se 10 colônias (5 típicas e 5 atípicas). Repicou-se cada colônia para um tubo contendo caldo infuso cérebro coração (BHI). Incubou-se a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 18 a 24 horas.

Para se verificar a prova da coagulase positiva, transferiu-se de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho, na proporção 1:3 solução salina. Procedeu-se da mesma forma com os tubos das culturas de referência utilizados para o controle positivo e negativo da prova. Incubou-se a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 6 horas. Na reação negativa, não ocorreu formação de coágulo; na reação positiva, houve coagulação de todo o conteúdo do tubo, que não se despreendeu quando o tubo foi invertido. Outra prova foi realizada pela coloração pelo método de Gram, identificando-se os cocos gram positivos em arranjo de cacho de uva.

### 3.3.3 Contagem de *Clostridium perfringens*

A contagem foi realizada por meio da inoculação das diluições seriadas das amostras em placas Ágar Triptona Sulfito Cicloserina (TSC). Das três diluições da amostra, inoculou-se 1ml de cada amostra na superfície de placas, contendo Ágar (TSC), previamente preparadas. Espalhou se o inóculo com uma alça de drigalski, das placas de maior para menor diluição, até que o excesso do líquido fosse absorvido. Em seguida, cobriu-se com uma sobrecamada do mesmo meio. Aguardou-se a solidificação da sobrecamada do meio. Incubou-se a  $35\text{-}37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h, em atmosfera anaeróbia. A contagem das colônias presuntivas foi realizada por meio da contagem das colônias pretas típicas. Para confirmação, selecionaram-se cinco colônias típicas, inoculando-se no meio Tioglicolato (TGM). Incubou-se a  $35\text{-}37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h, em atmosfera anaeróbia. Os procedimentos de confirmação são em Caldo Lactose Sulfito (LS) ou em teste de fermentação da glicose, hidrólise da gelatina, redução do nitrato e motilidade e coloração de Gram.

### 3.3.4 Contagem de *Bacillus cereus*

Das três diluições da amostra, inoculou-se 1ml de cada amostra na superfície de placas, contendo Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP), previamente

preparadas. Espalhou-se o inóculo com uma alça de drigalski, das placas de maior para menor diluição, até que o excesso do líquido fosse absorvido. Este foi incubado a 30-31 °C por 24 horas. Selecionaram-se cinco colônias típicas (rosas com grande halo opaco) de precipitação, inoculando-se no meio ágar sangue. Estas foram incubadas a 35-37 °C por 24 horas. A confirmação se deu pela presença de hemólise (+), halo transparente e coloração de Gram.

### 3.3.5 Contagem de *Listeria monocytogenese*

A contagem baseiou-se na inoculação das diluições desejadas das amostras sob placas em ágar ALOA. Inoculou-se 1ml de cada amostra na superfície de placas contendo meio de cultura Ágar Listeria Ottaviani&Agosti (ALOA) previamente preparadas (três diluições seriadas). Espalhou-se o inóculo com uma alça de drigalski, das placas de maior para menor diluição. Incubou-se a 36 °C ± 1 °C, por 48 horas. A contagem das colônias foi feita na diluição onde foi possível realizá-la. As colônias típicas apresentaram-se verde-azuladas com halo. As provas confirmatórias foram realizadas por meio da seleção das colônias típicas, estriadas em ágar triptase de soja extrato de levedura (TSA- YE). Estas foram incubadas a 36°C ± 1°C por 18 a 24 horas. Fizeram-se a prova da coagulase (+) e a coloração de Gram (+).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A microbiota da silagem desempenha papel fundamental na qualidade do processo de conservação da forragem, dividida basicamente em dois grupos, os microrganismos desejáveis, representados pelas bactérias do ácido lático (BAL), e aqueles indesejáveis, que estão associados às perdas durante a ensilagem, ocasionadas pela deterioração anaeróbia (*Clostridium* spp.) ou deterioração aeróbia (*Bacillus* spp. *Listeria* spp., e fungos filamentosos). O presente trabalho pesquisou a contagem dos microrganismos indesejáveis em silagem, nas diferentes fazendas da região de Lagoa Formosa-MG, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Resultados das análises microbiológicas da silagem de milho da região de Lagoa Formosa-MG, 2021

Fazendas	Fungos	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenese</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g
Fazenda A	>1,0 x 10 <sup>12</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>	>1,0 x 10 <sup>4</sup>	ausência	ausência
Fazenda B	ausência	ausência	ausência	ausência	ausência
Fazenda C	>1,0 x 10 <sup>12</sup>	> 1,0x 10 <sup>10</sup>	>1,0 x 10 <sup>4</sup>	ausência	>1,0x 10 <sup>1</sup>
Fazenda D	>9,0 x 10 <sup>3</sup>	ausência	4,0 x 10 <sup>2</sup>	ausência	ausência
Fazenda E	>1,0 x 10 <sup>12</sup>	ausência	5,6 x 10 <sup>3</sup>	ausência	5,0 x 10 <sup>1</sup>

Fonte: Resultados analíticos da pesquisa.

Das amostras avaliadas nesta pesquisa, quanto à presença de fungos, 80% das amostras apresentaram elevada contagem, com valores acima de 10<sup>12</sup> UFC/g. Observou-se, em 20 % das amostras, a presença de 9x 10<sup>3</sup> UFC/g. Já 20% das amostras não

apresentaram crescimento de fungos. Resultado semelhante à pesquisa de Lopes *et al.* (2012), que observou fungo em 100% das amostras. Aproximadamente 94,4% das amostras apresentaram teor acima de  $10^4$  UFC/g para fungos, sendo que 12,71% destas chegaram a  $10^8$  UFC/g. Segundo Pozza (2011), silagens que apresentam contagem de leveduras superior a 5,0 log/g de silagem são mais susceptíveis à deterioração.

Fungos filamentosos têm efeito no valor nutritivo do material ensilado, pois degradam as silagens, além de produzirem toxinas que afetam o metabolismo e a saúde animal. Em geral, os bolores são aeróbios, exigem pH ótimo (entre 5-6) para crescimento (POZZA, 2011).

O desenvolvimento de fungos ocorre em silagens, principalmente nas regiões periféricas do silo. Por esse motivo devem ser eliminadas. Podem ocorrer no interior da silagem, dependendo de condições de pH, matéria seca, compactação, tipo de forragem, entre outros fatores. Em consequência do desenvolvimento de fungos que produzem micotoxinas, o oferecimento de silagem contaminada aos animais pode gerar problemas à saúde (OLIVEIRA, 2016).

Fungos são microrganismos indesejáveis no processo de silagem, pois os esporos são capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo dos ruminantes, e sua ocorrência no leite cru tem relação com alto número de esporos nas fezes. A presença de  $O_2$  promove a proliferação de microrganismos indesejáveis presentes no material, que se desenvolvem através das reservas energéticas da forragem, levando a perdas no valor nutritivo da silagem e redução do consumo pelos animais (SOUSA *et al.*, 2021). Sob condições de aerobiose, leveduras podem oxidar o ácido graxo, gerando aumento do pH das silagens, permitindo o desenvolvimento de outros microrganismos, como fungos (OLIVEIRA, 2016).

Em geral, os fungos são apontados como principais responsáveis pela deterioração aeróbia de silagens, com destaque para fungos filamentosos e leveduras. As populações de leveduras em silagens podem variar de  $< 10^2$  UFC para valores de  $10^{12}$  UFC/ g forragem num intervalo de tempo de 3 dias. Além disso, a vulnerabilidade da silagem para deterioração aeróbia é função da população de leveduras. Caso a silagem apresente populações acima de  $10^5$  UFC/g forragem, o problema da deterioração já estará instalado no sistema (SOUSA *et al.*, 2021).

Em relação à presença de *Bacillus cereus*, foi verificado o crescimento desse microrganismo em 60% das amostras, com elevada contagem em 20% das amostras de silagem de milho estudadas. A população de *Bacillus cereus* variou de  $1,0 \times 10^1$  UFC em 40% das amostras avaliadas, e não apresentaram crescimento de *Bacillus cereus* em 40% das amostras.

Esse resultado se assemelha ao estudo de Santos (2016), que encontrou a presença do microrganismo em 64,8% das amostras estudadas. A população média de microrganismos aeróbios formadores de esporos foi de 4,09 log UFC.g-1, variando entre 0,00 e 6,19 log UFC.g-1. Em 64,8% das amostras avaliadas, a população encontrada desses microrganismos foi acima de 4,01 log UFC.g-1.

Segundo Oliveira (2016), a presença de *Bacillus cereus* nas silagens de milho pode variar de  $10^{-3}$  a  $10^{-9}$  esporos por g-1 de silagem. Altos níveis de esporos frequentemente estão presentes nas camadas superficiais do silo. Microrganismos do gênero *Bacillus cereus* conseguem fermentar uma variedade grande de carboidratos a



ácidos orgânicos, como etanol, 2,3-butanodiol e glicerol. Esses compostos não possuem um efeito na preservação da silagem, e essas bactérias competem com as BAL pelos carboidratos.

A silagem se contamina com esse agente, principalmente pelo carreamento de terra para interior do silo, e a presença aumenta consideravelmente quando é utilizado dejetos de animais na lavoura (NOVINSKI, 2013). Em um estudo realizado por Rammer *et al.* (1994), constatou-se que, utilizando-se 28 dejetos de bovinos em lavouras de milho destinadas para produção de silagem, percebeu-se uma elevação no número desses microrganismos na forragem, chegando a  $10^5$  UFC/g de matéria natural.

Da mesma forma, as camadas próximas da superfície podem apresentar uma quantidade maior de *Bacillus cereus* em relação às porções mais profundas, devido à maior condição anaeróbia encontrada nessas áreas. A preocupação com a presença desse microrganismo na silagem está relacionada com os estágios iniciais de deterioração e com os riscos que podem causar para saúde humana e dos animais, contaminados via ingestão de leite (NOVINSKI, 2013). Tal microrganismo é indesejável ao processo, pois os esporos são capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo dos ruminantes, e sua ocorrência no leite cru tem sido associada a alto número de esporos nas fezes (OLIVEIRA, 2016).

Neste estudo, a *Listeria monocytogenes* foi isolada em 80 % das amostras de silagem de milho. Constatou-se elevada contagem, com valores superiores a  $10^4$  UFC/g em 40% das amostras, e um intervalo de  $4,0 \times 10^2$  a  $5,6 \times 10^3$  UFC/g em 40% das amostras analisadas. Em 20% das amostras, não foi verificado o crescimento desse microrganismo. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Vilar *et al.* (2007), que detectaram *Listeria* spp. em 33,7% das amostras de silagem. Também Oliveira (2016) observou, em 46,66% das amostras, a presença de *Listeria monocytogenes*. Os resultados concordam com os resultados obtidos por Konosonoka *et al.* (2012), que encontraram *Listeria monocytogenes* em 29,2% das amostras.

Lopes (2012) observou contaminação por *Listeria monocytogenes* das silagens estudadas e relatou que teores acima de  $10^4$  UFC/g caracterizam a silagem como de má qualidade. O crescimento e a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* na silagem são determinados pelo grau de anaerobiose e o pH da silagem. As bactérias *Listeria monocytogenes* podem suportar valores de pH de 3,8 a 4,2 por longos períodos se o oxigênio estiver presente, mesmo que em baixos níveis.

Compreende-se que a presença e o desenvolvimento da bactéria *Listeria monocytogenes* em forragens ensiladas está relacionado ao pH. Esse microrganismo não se desenvolve em pH inferior a 5,2. Em silagens com o pH elevado, poderá ocorrer desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*. A contaminação com *Listeria monocytogenes* ocorre com mais frequência nas regiões periféricas do silo onde há mais alterações na conservação da silagem. Portanto, deve-se proceder a eliminação dessa silagem mal conservada para se evitarem problemas de contaminação (SILVA, 2002).

A silagem que é obtida pelo processo de fermentação natural também está frequentemente associada à listeriose animal. Doença infecciosa causada pelo microrganismo *Listeria monocytogenes*, que pode infectar pessoas e animais e manifestar-se de forma severa, meningite, encefalite, aborto ou septicemia. Grande parte da contaminação é por *L. monocytogenes*, que ocorre em zonas onde o desenvolvimento de

bolores é evidente. A silagem ainda pode contaminar o leite durante a ordenha. O leite pode se tornar veículo de listeriose humana, caso o tratamento térmico do leite não seja efetivo (LOPES, 2012). Os animais podem infectar-se pela ingestão de alimentos contaminados como silagem, pasto, palha e outros tipos de alimentos (SILVA, 2002).

Não houve crescimento de *Clostridium perfringens* nas amostras das cinco fazendas analisadas neste estudo. No entanto, Jobim *et al.* (2008) encontrou, em seu estudo, esporos de *Clostridium perfringens* de 0,1 e 0,2 log UFC/g, respectivamente, em silagens de espigas e de grãos, sendo considerados baixos tais valores. Os resultados observados estão em concordância com a expectativa de uma baixa contaminação por esse gênero de bactérias, pois as características das silagens não favorecem o seu desenvolvimento. Segundo Woolford (1972), a baixa contaminação por bactérias do gênero *Clostridium* spp. pode ser creditada ao alto teor de matéria seca das silagens. Os *Clostridium perfringens* são sensíveis à pressão osmótica, tendo sua atividade reduzida em silagens com alto teor de MS.

*Clostridiuns* spp. são microrganismos anaeróbios obrigatórios, e os seus efeitos sobre a qualidade da silagem normalmente ocorrem depois de as BAL pararem de crescer ativamente no silo. O principal produto da sua fermentação é o ácido butírico (AB), como também ácido acético (AA), ácido propiônico (AP) e etanol. Possuem efeito negativo sobre a qualidade da silagem, liberando CO<sub>2</sub>, gerando perdas de massa seca (MS) e energia, principalmente quando o pH se encontra acima de cinco e elevado teor de umidade (MACÊDO *et al.*, 2017). Segundo Oude Elferink *et al.* (1999), uma silagem com atividade típica clostridiana possui como características altas concentrações de ácido butírico (>5 g/kg MS), alto pH (> 5), baixos teores de MS e alto teor de amônia e amina (MOMBACH, 2014).

É um microrganismo indesejável em silagens, pois competem com as bactérias ácido-láticas durante a fermentação, produzindo ácido acético e butírico, que não têm o mesmo potencial de redução do pH das silagens (MOREIRA *et al.*, 2018). De acordo com Silva (2002), *Clostridium perfringens* atua contra a preservação, por meio da destruição do ácido láctico, levando a aumento no pH. Além disso, a fermentação clostrídica pode resultar em subprodutos da degradação de proteínas, como as aminas e amônia que podem restringir o consumo (SILVA, 2002).

A presença de *Clostridium perfringens* em silagens está relacionada à qualidade do leite. Devido ao fato de os esporos de *Clostridium perfringens* serem capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo de uma vaca, podem ser transferidos para o leite, via contaminação fecal do úbere (SANTOS, 2016).

Na pesquisa realizada, foi verificada a presença de *Staphylococcus aureus* em 40% das 5 amostras de silagem de milho pesquisadas. Devido à ausência de trabalhos com pesquisa de *Staphylococcus aureus* em silagem de milho, não foi possível fazer comparação dos resultados com outros autores.

Amplamente distribuídos no ambiente, os *Staphylococcus aureus* fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de pessoas saudáveis. O *Staphylococcus* spp. é um dos agentes mais comuns responsáveis por surtos de intoxicação alimentar. O *S. aureus* é um dos principais agentes causadores de infecções na glândula mamária de vacas produtoras de leite, sendo considerado o microrganismo patogênico mais frequentemente isolado de leite cru e em quadros de mastite (PRADO *et al.*, 2015).

## 5 CONCLUSÃO

Apesar de ter sido registrada uma baixa contagem de *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, o presente estudo constatou que, as silagens de milho da região de Lagoa Formosa apresentaram uma qualidade microbiológica insatisfatória, devido à elevada presença de *Listeria monocytogenes* e fungos. A elevada contagem de *Listeria monocytogenes* caracteriza a silagem como de má qualidade. Pode infectar pessoas e animais. Sua contaminação ocorre nas regiões periféricas do silo, onde há crescimento de fungos e alterações na conservação da silagem.

Conclui-se que a qualidade microbiológica está relacionada ao elevado crescimento de fungos, sendo estes mais susceptíveis à deterioração da silagem e ao crescimento de outros microrganismos indesejáveis como a *Listeria monocytogenes*.

## REFERÊNCIAS

BERNARDES, Thiago Fernandes. **Controle da deterioração aeróbia de silagens**. 2006. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2006.

BIANCHET, E. A.; ROSSI, E. M.; BEURON, D. C. Estudo quali-quantitativo de microrganismos deteriorantes presentes em silagens produzidas no extremo-oeste catarinense. **Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 2018. Disponível em:  
<https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/siepe/article/view/18738>.

CARVALHO, P. A. **Influência do genótipo e maturidade na diversidade microbiológica em milho grão para silagem**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014. Disponível em:  
<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-11082014-162817/pt-br.php>.

FRANÇA, André Madeira Silveira *et al.* Dinâmica química, microbiológica e física da silagem de farelo úmido de glúten de milho. **Ciência Rural**, v. 45, p. 684-689, 2015. Disponível em:  
<https://www.scielo.br/j/cr/a/xsTmKcD3VMzWRFM5MDCHY6k/abstract/?lang=pt>.

HORN, M. B. **Micotoxinas em silagens de milho do sul do Brasil e metodologia analítica para aflatoxinas por espectroscopia de infravermelho próximo em milho**. 2013. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2013. Disponível em:  
<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/122690>.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11290-2**: 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*: part 2: enumeration method. Geneva, 2004.

JOBIM, C. C. *et al.* Desenvolvimento de microrganismos durante a utilização de silagens de grãos úmidos de milho e de espigas de milho sem brácteas. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 671-676, 2008.

KONOSONOKA, I. H. *et al.* Incidence of *Listeria* spp. in dairy cows feed and rawmilk in Latvia. **International Scholarly Research Network: veterinary Science**, New York, 2012. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/435187/>.

LOPES, C. F.; TRANCHES, T. A.; SILVA, A. V. *et al.* Características químico-bromatológicas e microbiológicas de silagem de milho sob distintos espaçamentos entre linhas e diferentes manejos de plantas daninhas. CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29., 2012, Águas de Lindóia. **Anais [...] Águas de Lindóia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo**, 2012. p. 3333-3338. Disponível em: [https://www.abms.org.br/eventos\\_anteriores/cnms2012/11663.pdf](https://www.abms.org.br/eventos_anteriores/cnms2012/11663.pdf).

MACÊDO, A. J. S. *et al.* Microbiologia de silagens: revisão de literatura. **REDVET**, v. 18, n. 9, p. 1-11, set. 2017. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63653009020.pdf>.

MOMBACH, M. A. **Silagem de grão de milho triturado e reidratado contendo glicerina bruta e inoculante microbiano**. 2014. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, 2014.

MOREIRA, L.; GUERRA, M. E. M.; CASTAGNARA, D. D. Perfil microbiológico de silagens de sorgos iss90s, qualysilo e milho agromem 3m51. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 10, n. 2, 3 mar. 2020.

NOVINSKI, C. O. **Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens em infravermelho**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/31219>.

NUSSIO, L. G. **Qualidade de silagens de milho confeccionadas com diferentes filmes e desempenho produtivos de vacas em lactação**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-12112013-104032/pt-br.php>.

OLIVEIRA, A. S. **Caracterização de silagens de milho produzidas em minas gerais e caracterização metabólica e genotípica de bactérias do ácido lático isoladas dessas silagens**. 2016. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/11049>.

POZZA, M. S. dos S. *et al.* Populações microbianas e composição química de silagem de milho. **Scientia Agraria Paranaensis**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. p. 91, 2011. Disponível em: <https://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/5287>.

PRADO, R. R.; FREITAS, E. D. A.; JUNIOR, E. C. V.; COSTA, P. C.; SIQUEIRA, M. C.; RAMMER, C.; OSTLING, C.; LINGVALL, P., LINDGREN, S. Ensiling of manured crops – effects on fermentation. **Grass and Forage Science**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 343-351, 1994.

PRADO, Renata Resende *et al.* Staphylococcus spp.: importantes riscos à saúde pública. **Pubvet**, v. 9, p. 348-399, 2015.

RAMMER, C. *et al.* Ensiling of manured crops: effects on fermentation. **Grass and forage science**, v. 49, n. 3, p. 343-351, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1994.tb02009.x>

SÁ NETO, A. **Caracterização microbiológica, parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia em silagens de forragens tropicais com aditivos microbianos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-11122012-092200/pt-br.php>.

SANTOS, A. O. **Seleção e avaliação de cepas bacterianas para ensilagem de milho**. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/1580>.

SANTOS, A. O. **Caracterização de silagens de milho produzidas em Minas Gerais e caracterização metabólica e genotípica de bactérias do ácido lático isoladas dessas silagens**. 2016. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/11049>.

SILVA, J. M. N. **Desenvolvimento de microrganismos e valor nutritivo de silagens de capim-Tifton 85**. 2002. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2002.

SOUSA, Pamella Grossi de *et al.* Micotoxinas em silagem. **PUBVET**, v. 16, p. 191, 2021. Disponível em:

[https://web.archive.org/web/20220209173546id\\_/https://www.pubvet.com.br/uploads/52cd360a6fa3c4cdc82dffe4e3977576.pdf](https://web.archive.org/web/20220209173546id_/https://www.pubvet.com.br/uploads/52cd360a6fa3c4cdc82dffe4e3977576.pdf).

VIEIRA, V. C. *et al.* Caracterização da silagem de milho, produzida em propriedades rurais do sudoeste do Paraná. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 4, p. 462-469, jul./ago. 2011.

VILAR, M. J. *et al.* Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 11, p. 5083-8, 2007.

VIVAS, D. N. *et al.* Avaliação microbiológica de silagens de milho exclusivo ou em consórcio com gramíneas. CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 23., 2013, Foz do Iguaçu. **Anais [...] Foz do Iguaçu: ZOOTEC**, 2013.

WOOLFORD, M. K. Some aspects of the microbiology and biochemistry of silage making. **Herbage Abstr.**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 105-111, 1972.

WOSNIAK, A. B. **Qualidade de silagens de milho confeccionadas com diferentes filmes de vedação e desempenho produtivo de vacas em lactação**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.