



**FÁBIA GIOVANA DO VAL ASSIS**

**EFEITO DE NOVOS INOCULANTES NA  
FERMENTAÇÃO DE SILAGENS DE MILHO**

**LAVRAS - MG**

**2013**

**FÁBIA GIOVANA DO VAL ASSIS**

**EFEITO DE NOVOS INOCULANTES NA FERMENTAÇÃO DE  
SILAGENS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Processos Fermentativos Aplicados à Agroindústria, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila

Coorientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS - MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Assis, Fábiana Giovana do Val de.

Efeitos de novos inoculantes na fermentação de silagens de milho / Fábiana Giovana do Val de Assis. – Lavras : UFLA, 2013.  
89 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Carla Luiza da Silva Ávila.

Bibliografia.

1. Bactérias do ácido láctico. 2. Inoculação. 3. Ácidos graxos voláteis. 4. Leveduras. 5. Fungos filamentosos. 6. Estabilidade aeróbia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.28449

**FÁBIA GIOVANA DO VAL ASSIS**

**EFEITO DE NOVOS INOCULANTES NA FERMENTAÇÃO DE  
SILAGENS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Processos Fermentativos Aplicados à Agroindústria, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2012.

Dr. José Cardoso Pinto                      UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan                UFLA

Dr. Whasley Ferreira Duarte               UFLA

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2013**

A minha mãe, irmão e familiares,  
por todo amor e apoio depositados

**OFEREÇO**

A Deus, por ter me concedido  
esta conquista! Aos meus amigos  
e familiares, pelo carinho e a amizade

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo amor e perseverança a mim concedidos para realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Dra. Carla Luiza da Silva Ávila, pela orientação, competência e confiança depositadas no meu trabalho.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pelo exemplo de profissionalismo, pelos conhecimentos, ensinamentos transmitidos e atenção a mim concedidas.

Aos professores do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, em especial, Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista, Dr. Eustáquio Souza Dias, Dr. Disney Ribeiro Dias, Dr. Whasley Ferreira Duarte, pela constante participação, apoio e ensinamentos fundamentais para minha formação acadêmica e científica.

Ao professor José Cardoso Pinto, do Departamento de Zootecnia, pelo incentivo e colaboração na realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões ao trabalho a fim de melhorá-lo.

A todos os colegas da Microbiologia Agrícola, em especial a Andréia de Oliveira dos Santos, pelos ensinamentos e exemplo de dedicação ao trabalho.

Ao Departamento de Zootecnia, pelo fornecimento das plantas de milho, por disponibilizar o espaço e equipamentos para realização de parte de experimentos deste trabalho.

À *Lallemand Animal Nutrition*, pelo fornecimento das cepas comerciais.

Às técnicas dos laboratórios, Cidinha e Ivani, por toda ajuda concedida, amizade e carinho.

À Patrícia, Anita e Phoebe, companheiras de república, pelo carinho, conselhos e, principalmente, pela amizade e incentivo.

A minha mãe ao irmão que sempre foram e serão o alicerce de cada etapa da minha vida e com quem sempre irei compartilhar cada conquista.

Muito Obrigada!

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação de oito cepas de bactérias do ácido lático (BAL), pré-selecionadas e isoladas de cana-de-açúcar, além de uma cepa de BAL comercial (Lalsil Cana), sobre diferentes parâmetros que influenciam a qualidade da silagem de milho. A inoculação da forrageira para ensilagem consistiu de duas dosagens (5 e 6 log UFC g<sup>-1</sup>) para cada cepa de BAL testada. O trabalho foi conduzido em silos experimentais de PVC, durante 3 meses, sendo que aos 30 e 90 dias de fermentação os silos foram abertos para a retirada de amostras de silagem destinadas a avaliações quanto às características químico-bromatológicas e microbiológicas, ao perfil de fermentações de metabólitos (ácidos graxos voláteis e álcoois) e à estabilidade aeróbia. Os resultados evidenciaram que as dosagens dos inoculantes não promoveram diferenças significativas sobre as características avaliadas para as amostras de silagem, exceto para FDN, pH e fungos filamentosos. Não foi observada influência significativa dos tratamentos nas seguintes variáveis: MS, CHO, concentrações de ácido lático, etanol, exceto para ácido acético, 1,2-propanodiol, e valor de pH. O tempo de fermentação exerceu influência significativa, favorecendo o aumento das perdas de MS, do teor de ácido acético, 1,2-propanodiol, etanol, pH aos 90 dias de fermentação. Para as análises microbiológicas foi verificada a influência significativa dos tratamentos sobre a população de BAL, fungos filamentosos. O tempo de fermentação exerceu ainda influência significativa sobre a população de microrganismos na silagem, ocorrendo, a diminuição do número de BAL, fungos filamentosos, e o aumento de leveduras com o decorrer do processo fermentativo. Quanto às variáveis Temperatura máxima, Tempo para atingir a temperatura máxima e Estabilidade aeróbia não foi verificada influência dos tratamentos, mas aos 90 dias de fermentação foi observado diminuição da T<sub>m</sub>, TTMAX, e melhoria da EA, evidenciando a vantagem da inoculação com cepas de BAL ao longo do processo de fermentação. A inoculação com as diferentes cepas de BAL alterou de forma similar as características bromatológicas sem apresentar, no entanto, diferenças no valor nutritivo das silagens de milho avaliadas após o período de fermentação. Efeitos diferentes sobre as populações de BAL e fungos filamentosos foram proporcionados pelos tratamentos inoculados nas silagens de milho, fato este não observado para a população de leveduras. Determinou-se para os tratamentos testados que a dose de inoculação indicada é a de 6 log UFC g<sup>-1</sup> de forragem por proporcionar a maior redução de fungos filamentosos na silagem de milho, reduzindo, dessa forma, a deterioração aeróbia por esses microrganismos.

Palavras-chave: Bactérias do ácido lático. Inoculação. Ácidos graxos voláteis. Leveduras. Fungos Filamentosos. Estabilidade aeróbia.

## ABSTRACT

This present work had as objective to evaluate the inoculation effects of eight strains of lactic acid bacteria (LAB), pre-selected and isolated from sugar cane, and a commercial strain of LAB (Lalsil Cane) on different parameters that influence the quality of corn silage. Inoculation of forage for silage consisted of two doses (5 and 6 log UFC g<sup>-1</sup>) for each strain of LAB tested. The work was conducted in silos of PVC, for 3 months, and at 30 and 90 days of fermentation, the silos were opened for removal of silage samples intended for evaluations as chemical-bromatologic and microbiological characteristics to profile of fermentations metabolites (volatile fatty acids and alcohols) and aerobic stability. The results showed that the inoculants dosages did not promote significant differences on characteristics evaluated for silage samples, except for NDF, pH and filamentous fungi. No significant influence of the treatments reported in the following variables: MS, CHO, concentrations of lactic acid, ethanol, except for acetic acid, 1,2-propanediol, and pH value. The fermentation time affected significantly, favoring an increase of DM losses, the acetic acid content, 1,2-propanediol, ethanol, pH to 90 days of fermentation. About to microbiological analyzes was verified the significant influence of the treatments on the LAB population, filamentous fungi. The fermentation time also exercised significant influence over the population of microorganisms in silage, occurring, decreasing in the LAB number, filamentous fungi, and the increase of yeasts over the fermentation process. Regarding variables T<sub>m</sub>, TTMAX and Aerobic stability (AS) has not been reported influence of the treatments, but in 90 days of fermentation was observed decrease in T<sub>m</sub>, and TTMAX and AS increased, showing the inoculation advantage with LAB strains along the fermentation process. The inoculated with different LAB strains changed similarly the bromatologic characteristics without showing, however, differences in nutritional value of corn silage evaluated after the fermentation period. Different effects on LAB populations and filamentous fungi were provided by the treatments inoculated in corn silage, which is not observed for yeast population. It was determined that the tested treatments for the indicated dose inoculation is 6 log UFC g<sup>-1</sup> of forage for providing the greatest reduction of the fungi filamentous in corn silage, thus, reducing the aerobic deterioration by these microorganisms.

Keywords: Lactic acid bacteria (LAB). Inoculation. Volatile fatty acids. Yeasts. Filamentous fungi. Aerobic stability.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV – Ácidos graxos voláteis

BAL – Bactérias do ácido láctico

BAP – Bactérias do ácido propiônico

CHO - Carboidratos solúveis

DRBC – Dicloran Rosa de Bengala Clorafenicol

EA - Estabilidade aeróbia

FDN – Fibra em detergente neutro

*MRS – De Man Rogosa Sharpe*

MF – Matéria fresca

MS – Matéria seca

PB – Proteína bruta

pH – potencial hidrogeniônico

PKA – Constante de dissociação ácida

PVC - Cloreto de polivinila

T<sub>m</sub> – Temperatura máxima

TTMAX - Tempo para atingir temperatura máxima

UFC - Unidades formadoras de colônia

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação molecular das cepas de bactérias do ácido láctico (BAL) estudadas .....	45
Tabela 2	Composição química e microbiológica do milho antes da ensilagem .....	46
Tabela 3	Probabilidade dos efeitos (p) e valores médios da composição bromatológica das silagens de milho .....	50
Tabela 4	Probabilidade dos efeitos (p) e valores médios metabólitos e população de bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras das silagens de milho.....	53
Tabela 5	Metabólitos e população de bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras nas silagens de milho .....	54
Tabela 6	População de fungos filamentosos e valores de pH das silagens de milho adicionadas de diferentes inoculantes em dois tempos de fermentação .....	63
Tabela 7	Probabilidade dos efeitos (p) para os dados referentes à estabilidade aeróbia das silagens.....	69

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TÉORICO</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>Princípios da ensilagem</b> .....	15
<b>2.1.2</b>	<b>Silagem de milho</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Microbiota da silagem</b> .....	20
<b>2.2.1</b>	<b>Bactérias do ácido láctico (BAL)</b> .....	21
<b>2.2.2</b>	<b>Enterobactérias</b> .....	23
<b>2.2.3</b>	<b>Bactérias esporogênicas</b> .....	24
<b>2.2.4</b>	<b>Principais microrganismos associados à deterioração aeróbia das silagens</b> .....	25
<b>2.3</b>	<b>Inoculantes</b> .....	28
<b>2.4</b>	<b>Inoculantes para silagem de milho</b> .....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
<b>3.1</b>	<b>Preparo dos inoculantes</b> .....	37
<b>3.1.1</b>	<b>Preparo do milho para ensilagem</b> .....	37
<b>3.1.2</b>	<b>Preparo da silagem de milho e formação dos tratamentos</b> .....	38
<b>3.2</b>	<b>Avaliação das características químicas e microbiológicas das silagens</b> .....	38
<b>3.2.1</b>	<b>Análises químico-bromatológicas</b> .....	39
<b>3.2.2</b>	<b>Avaliação das perdas de matéria seca</b> .....	40
<b>3.2.3</b>	<b>Análises microbiológicas</b> .....	41
<b>3.3</b>	<b>Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens</b> .....	42
<b>3.4</b>	<b>Delineamento experimental e análises estatísticas</b> .....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>4.1</b>	<b>Características das cepas utilizadas como inoculantes</b> .....	44
<b>4.2</b>	<b>Composições química e microbiológica da planta do milho</b> .....	45
<b>4.3</b>	<b>Características das silagens</b> .....	47
<b>4.4</b>	<b>Metabólitos e características microbiológicas</b> .....	51
<b>4.5</b>	<b>Avaliação da estabilidade aeróbia</b> .....	68
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	73
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74

## 1 INTRODUÇÃO

Com a evolução da pecuária, os produtores brasileiros passaram a adotar os sistemas de produção intensiva, necessitando, dessa forma, de forragem de boa qualidade durante o ano todo. Diante desse contexto, nos últimos anos houve a ampliação das técnicas de conservação de forragem, sendo a ensilagem o processo mais preponderante nos sistemas produtivos.

A ensilagem compreende a conservação das plantas forrageiras em ambiente com reduzida concentração de oxigênio, a fim de minimizar as perdas de nutrientes e de energia, conservando o valor nutritivo e as características o mais próximo possível aos da forragem original. O estabelecimento da condição de baixa concentração de oxigênio na silagem é comprometido pela entrada de ar durante o período de estocagem ou na abertura do silo, favorecendo o crescimento de microrganismos oportunistas. Dessa forma, alguns produtos da fermentação passam a ser substrato para microrganismos, que outrora latentes, começam a se desenvolver. A remoção de grande parte do ar pela compactação pode proporcionar condições favoráveis para o crescimento de bactérias ácido-láticas (BAL) (anaeróbios aerotolerantes), sendo essas o principal grupo de microrganismos responsáveis pelo processo de conservação da massa ensilada. As BAL fermentam os carboidratos solúveis, ou açúcares (mono e dissacarídeos) presentes na planta, produzindo ácidos, os quais reduzem o pH da massa ensilada, inibindo o crescimento de microrganismos capazes de promover a deterioração do material ensilado.

A planta de milho, (*Zea mays* L.) é a forrageira mais utilizada para ensilagem em todo o mundo. Essa forrageira apresenta características adequadas para confecção de silagens de boa qualidade como teor de matéria seca (MS) entre 28% e 42%, alto valor energético na matéria original e baixo poder tampão, o que proporciona um padrão adequado de fermentação microbiana,

além de alta produção de MS por unidade de área, e apresentando também alta ingestão pelo animal. O milho apresenta outras características desejáveis ao processo da ensilagem, como por exemplo: possibilidade de colheita para grãos ou silagem, facilidade de mecanização da cultura da sementeira até a ensilagem.

Embora, a cultura de milho apresente características favoráveis para a produção de silagem de boa qualidade, esta é bastante susceptível a perdas de nutrientes e deterioração aeróbia. Com isso, muitas pesquisas têm buscado novas alternativas com o objetivo de minimizar essas perdas, otimizando o processo fermentativo e preservando o valor nutritivo original. Dentre essas alternativas, destacam-se os inoculantes microbianos que têm sido utilizados nas forrageiras ainda frescas com o intuito de melhorar a fermentação e a conservação das silagens, prevenindo o crescimento de microrganismos deteriorantes. Os inoculantes bacterianos abrangem a classe de aditivos mais utilizados e com mais rápido desenvolvimento, sendo uma técnica extensamente difundida em todo o mundo. Existem atualmente no mercado inoculantes contendo diferentes espécies bacterianas. As BAL são o grupo mais utilizado, podendo incluir bactérias homofermentativas, heterofermentativas ou a combinação de ambas. Os inoculantes biológicos objetivam acelerar a queda do pH, induzindo a exclusão competitiva de microrganismos indesejáveis, reduzindo a perda de nutrientes durante o metabolismo fermentativo e no pós-abertura dos silos, momento de exposição aeróbia.

Embora, a maioria dos trabalhos demonstre a ação positiva de inoculantes sobre parâmetros fermentativos da silagem, estudos mostram que os resultados podem variar muito entre espécies forrageiras ou entre condições diferentes de ensilagem. Todavia, na literatura existem relatos de resultados contraditórios obtidos com a utilização dos inoculantes microbianos, uma vez que as melhorias no perfil fermentativo das silagens nem sempre são acompanhadas de melhoras no valor nutritivo e/ou ganhos no desempenho.

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da adição de novas cepas de BAL isoladas de silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), em diferentes doses sobre as características químicas e microbiológicas, bem como sobre a estabilidade no pós-abertura de silagens de milho.

## **2 REFERENCIAL TÉORICO**

### **2.1 Princípios da ensilagem**

A conservação de forragens na forma de silagem é um processo fermentativo, em que os carboidratos solúveis são convertidos em ácido orgânicos mediante atividade microbiana, principalmente pela produção de ácido láctico BAL (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Segundo Weinberg e Muck (1996), o processo de ensilagem pode ser dividido em quatro fases. A fase aeróbia corresponde ao período em que a forrageira está sendo ensilada, sendo caracterizada pelas reações de respiração e proteólise decorrentes da ação enzimática dentro das células vegetais e também pela ação de alguns microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos. Durante o manejo da forrageira, o rompimento das células das plantas libera uma grande quantidade de enzimas como amilase, hemicelulase, aumentando assim, o nível de carboidratos solúveis no material ensilado e enzimas proteolíticas, as quais rompem as proteínas em peptídeos, aminoácidos e amônia.

Nesta primeira fase, quando a forragem chega ao silo, microrganismos aeróbicos ou aeróbicos facultativos, como leveduras, fungos e certas bactérias, podem atingir altas concentrações. Como resultado tem-se um grande consumo de açúcar, o que, ao somar-se ao consumo decorrente da respiração dos tecidos da planta forrageira, pode significar perdas significativas de carboidratos solúveis. Se as condições aeróbicas permanecerem por longo tempo, durante o enchimento do silo, microrganismos como leveduras e fungos filamentosos, além do consumo de carboidratos, irão provocar o aquecimento excessivo da silagem.

O aumento da temperatura promoverá a quebra das proteínas em compostos nitrogenados, não proteicos, solúveis e provocar processos de

caramelização de carboidratos (temperaturas acima de 42 ou 44°C, as conhecidas reações de Maillard). Esses efeitos negativos da fase aeróbica, sobre a qualidade da silagem, podem ser minimizados pelo rápido enchimento, compactação e fechamento do silo.

A fase de fermentação inicia-se a partir do momento em que o oxigênio é consumido, ocorrendo diversos processos como rompimento das células intactas das plantas, liberando conteúdo celular, o qual contém açúcares e enzimas e a rápida multiplicação dos microrganismos, sendo que os de maior relevância para a preservação da silagem são as BAL, as leveduras, Enterobactérias, e *Clostridium* spp. As BAL contribuem para a preservação da silagem a partir da produção de ácido lático e outros ácidos orgânicos, os quais proporcionam a redução do pH e, conseqüentemente, a inibição da atividade metabólica de microrganismos indesejáveis. Segundo McDonald (1981), para preservar as forragens pela fermentação é imprescindível atingir uma condição anaeróbica, seguida do consumo dos carboidratos celulares pelas BAL e redução de pH e, por consequência, produção de ácido acético.

A fase estável ocorre após o período de crescimento ativo das bactérias produtoras de ácido lático, tendo como característica pequena atividade biológica (caso o silo tenha sido vedado corretamente) e uma possível degradação lenta de hemicelulose, liberando alguma quantidade de açúcar. Os principais fatores que podem comprometer a qualidade da silagem nessa fase é a permeabilidade do silo ao oxigênio e a compactação da silagem.

A fase de deterioração aeróbia pode ocorrer quando o silo é aberto e o oxigênio entra em contato com a massa ensilada. As leveduras e alguns fungos filamentosos são os microrganismos mais comuns envolvidos na deterioração aeróbica da silagem, contudo bactérias como as enterobactérias, bacilos e bactérias do gênero *Listeria* também podem ser responsáveis pelo processo de deterioração. Portanto, a presença desses microrganismos acarreta perda de

nutrientes de alta digestibilidade da silagem, prejuízos sanitários e algumas espécies de fungos filamentosos produzem compostos tóxicos que podem afetar a saúde animal.

A qualidade da silagem depende da eficiência do processo fermentativo e das condições de umidade e temperatura, da presença de oxigênio, da concentração de carboidratos solúveis e de características particulares da composição físico-química da planta ensilada. Os atributos químicos das plantas têm grande influência sobre a qualidade da silagem produzida, sendo os mais importantes o teor de umidade, a qualidade e quantidade dos carboidratos, o conteúdo proteico e o poder tampão da forragem (NEUMANN; RESTLE; BRONDANI, 2004). Fatores extrínsecos como o manejo de confecção da silagem, as condições climáticas e a microbiota epifítica, também são importantíssimos para assegurar a qualidade da silagem (MORAIS, 1999).

### **2.1.2 Silagem de milho**

O milho é considerado uma planta ideal para ensilagem, porque apresenta várias características desejáveis, tais como: alta produção de MS por área (16 a 21 T/ha) e alta digestibilidade (51 a 61%) (NEUMANN, 2013). Entretanto, deve-se ressaltar que a composição química da planta do milho tem grande influência sobre a qualidade da silagem produzida. Os atributos mais importantes que influenciam a fermentação microbiana, determinando a qualidade da silagem são o teor de umidade, a qualidade e quantidade de carboidratos solúveis e o poder tampão da forragem.

O teor de MS da planta, na época ideal de corte, deve se enquadrar num intervalo de 33 a 42%. Nesse intervalo de MS podem ser registrados o conteúdo favorável de carboidratos solúveis em água, baixo poder tampão e alto conteúdo de grãos (40-50%). Essas características favorecem a fermentação láctica que é

considerada ideal no processo de conservação das silagens (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

O estágio de maturação do milho no momento da colheita afeta a qualidade da silagem, pois o conteúdo de grãos, o teor de MS e a digestibilidade da planta variam de acordo com o desenvolvimento da cultura (PEDROSO et al., 2006). Lauer (1999) sugeriu que o teor de MS da planta deve ser o critério utilizado para confirmação do ponto ótimo de colheita da planta de milho para a ensilagem, sendo a evolução da linha de leite no grão o principal fator indicador. O momento de corte ideal é quando a planta alcança teor de MS entre 30 e 35%, sendo obtido nas plantas de milho no momento em que a consistência dos grãos estiver variando entre o estágio pastoso e o farináceo duro (NEUMANN, 2013).

O teor de MS pode favorecer a fermentação láctica e também influenciar as perdas de nutrientes da silagem. As plantas de milho colhidas com teores elevados de MS (40 a 45%) apresentam maiores níveis de perdas, principalmente em função da maior dificuldade de compactação proporcionando aquecimento da massa ensilada e menor taxa de fermentação, resultando em silagens de qualidade inferior. Enquanto a colheita de plantas com baixo conteúdo de MS propicia perdas durante a fermentação principalmente por favorecem a multiplicação de microrganismos indesejáveis, como clostrídeos além do aumento da produção de efluentes (FERREIRA, 2001).

Nos casos em que a forrageira não é colhida no estágio de maturidade adequado, os inoculantes podem ajudar a melhorar o processo fermentativo. Eichelberger, Siewerdt e Souza Júnior (1997) relataram que o uso de inoculantes na ensilagem de aveia preta melhorou as características fermentativas das silagens quando os teores de MS da planta estavam acima ou abaixo do ideal.

Os carboidratos presentes nas plantas são importantes para o processo da ensilagem. Os carboidratos fibrosos (CF) compreendem os polímeros que compõem a parede celular vegetal. Os carboidratos não fibrosos (CNF)

representam os açúcares solúveis em água (mono e dissacarídeos), amido e pectina que são rápida e completamente digeríveis no TGI (trato gastro intestinal) (MERTENS, 1987; MERTENS; HALEVI, 1996). Esses carboidratos podem ser considerados os principais substratos para a fermentação láctica no interior do silo (HENDERSON, 1993) e suas concentrações podem variar de acordo com a espécie, cultivar, clima e estágio de maturidade. Segundo Gourley e Lusk (1977), são necessários de 6 a 8% de carboidratos solúveis na MS do material verde para que ocorra uma adequada fermentação.

A capacidade dos microrganismos em utilizar os carboidratos dependerá do potencial metabólico microbiano, diferentes cepas das mesmas espécies de bactérias podem agir de forma diferente durante o processo fermentativo, o que indica que a escolha de estirpes para serem utilizadas como inoculantes em silagem é fator essencial, assim como a escolha da forrageira. Ávila et al. (2010) observaram que cepas distintas da espécie *L. plantarum*, utilizadas como inoculantes em silagem de cana-de-açúcar, apresentaram desempenhos diferentes na produção de ácido acético, sendo a cepa *L. plantarum* isolada de cana-de-açúcar mais eficaz na síntese de ácido acético, quando comparada a cepa *L. plantarum* Biomax 5®. Esses mesmos autores também relataram a produção diferenciada de ácido propiônico, em silagem de cana-de-açúcar, por *L. buchneri* cepa UFLA SIL 72 e *L. buchneri* pertencente ao inoculante comercial Pioneer 11A44TM, sendo a primeira cepa mais eficiente em produzir tal ácido quando comparada à cepa comercial.

Outro fator importante na ensilagem é o poder tampão das plantas que expressa a resistência da massa à redução do pH. A maior parte do poder tamponante das plantas pode ser atribuída aos ânions como os sais de ácidos orgânicos, ortofosfatos, sulfatos, nitratos e clorados. O milho apresenta baixo poder tampão durante a época ideal de corte, ou seja, a massa ensilada permite uma rápida queda do pH, o que é desejável. Fatores como o híbrido utilizado,

além de aspectos relativos ao solo e ao clima, também causam variações na qualidade da silagem (NEUMANN; MÜHLBACH; NÖRNBERG, 2007).

Com isso, considera-se que os cuidados para ensilagem começam no campo, passando pelo processo de fermentação, e continuam depois que os silos forem abertos para a alimentação dos animais. Após a abertura de um silo, observa-se progressiva deterioração aeróbia causada pela proliferação dos microrganismos oportunistas, em função do aumento do pH e concentração de oxigênio (PEDROSO et al., 2006).

As silagens de milho podem ser consideradas alimentos nobres, pois são dotadas de alto valor nutritivo, elevada produtividade, sendo, portanto, uma alternativa de alimento volumoso fundamental na cadeia produtiva intensiva tanto de bovinos de corte como de leite. Os cuidados com essas silagens após a abertura dos silos devem ser extremamente criteriosos em razão da maior instabilidade aeróbia da maior concentração de substratos potencialmente oxidáveis por microrganismos oportunistas (NEUMANN et al., 2006; SIQUEIRA; BERNARDES; REIS, 2005).

## **2.2 Microbiota da silagem**

O processo de ensilagem é bastante complexo, ocorrendo mudanças bioquímicas bruscas nos substratos pela ação dos microrganismos presentes nas forrageiras e pelos que se multiplicam nas silagens. O conhecimento da população microbiana é importante para compreensão das interações que ocorrem, principalmente quando as silagens são mal preservadas. Logo, conhecer as características dos microrganismos resultará em maior eficiência na utilização de recursos para melhoria das técnicas de conservação dos alimentos (SANTOS et al., 2008).

A microbiota da silagem encontra-se dividida em dois grupos distintos, os microrganismos desejáveis e os indesejáveis. Os microrganismos desejáveis são as bactérias do ácido lático (BAL) e bactérias do ácido propiônico (BAP) e os indesejáveis são aqueles microrganismos prejudiciais à conservação da forrageira em virtude da baixa capacidade e/ou incapacidade desses microrganismos. Os microrganismos indesejáveis podem apresentar alto consumo de nutrientes (leveduras, fungos filamentosos, bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Listeria* e bactérias do ácido acético) ou causarem deterioração aeróbica (leveduras,). Muitos não só diminuem o valor nutricional como podem causar doenças aos animais (SEGLAR, 2003; THUAULT et al., 1991).

Durante a ensilagem, os microrganismos capazes de crescer em meio com concentração reduzida de oxigênio (BAL, enterobactérias, clostrídios, alguns *Bacillus* spp. e leveduras) desenvolvem e competem pelos nutrientes disponíveis (BOLSEN, 1995). As mudanças ocorridas nos primeiros dias após a ensilagem são críticas para o sucesso da fermentação subsequente. Em condições favoráveis, com o teor de MS em torno de 30%, baixa concentração de oxigênio e presença de carboidratos solúveis, as BAL rapidamente acidificam o meio e a maioria dos microrganismos indesejáveis não são capazes de sobreviver, conduzindo, dessa forma, para uma silagem de baixo pH e estável.

### **2.2.1 Bactérias do ácido lático (BAL)**

As BAL são as principais responsáveis pela queda do pH, porque sintetizam maiores quantidades de ácido lático (SEALE, 1986). As BAL fazem parte da microbiota epifítica da forrageira e são representadas por várias espécies e se multiplicam ao longo da fermentação dos substratos. São bactérias gram-positivas, não produzem esporos, são anaeróbios aerotolerantes.

Com relação ao metabolismo, baseando-se na fermentação de açúcares, as BAL podem ser classificadas em homofermentativas obrigatórias (produzem exclusivamente ácido lático da fermentação de hexoses e não fermentam pentoses) e heterofermentativas. Essas últimas possuem duas vias de degradação de açúcares que as classificarão em heterofermentativas facultativas ou obrigatórias. Na primeira via, proposta por McDonald, Henderson e Heron (1991), as bactérias degradam carboidratos solúveis (glicose e frutose) em lactato, acetato, manitol, dióxido de carbono e água, sendo denominadas de bactérias heterofermentativas facultativas (AXELSON, 1993). Na segunda via, proposta mais recentemente por Oude-Elferink et al. (2001), as bactérias degradam ácido lático em ácido acético, 1,2- propanodiol, dióxido de carbono e traços de etanol, sendo classificadas como heterofermentativas obrigatórias (AXELSON, 1993).

A produção de etanol praticamente nula e o aumento na concentração de ácido acético como produto final da fermentação são justificados pelo fato das espécies heterofermentativas, em especial a *L. buchneri* (heterofermentativa obrigatória), não possuírem a enzima acetaldeído desidrogenase, responsável pela redução de acetaldeído a etanol (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Embora o ácido acético seja considerado pouco eficiente, quanto na função de reduzir o pH da silagem, porém apresenta ação antimicrobiana sobre leveduras e fungos filamentosos (MOON, 1983).

Assim, as espécies do gênero *Lactobacillus* podem ser divididas em três grupos, segundo Axelsson (2004); Grupo I: composto por BAL homofermentativas obrigatórias. Como exemplos têm-se *L. acidophilus*, *L. delbrückii*, *L. bovis*, *L. helveticus*. Grupo II: representado pelas BAL heterofermentativas facultativas como *L. plantarum*, *L. casei*, *L. sakei*, *L. curvatus*. Grupo III: são as BAL heterofermentativas obrigatórias, representadas

por *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*. A maior parte das BAL em silagens pertence aos dois últimos grupos.

Com relação às espécies de BAL frequentemente encontradas na silagem, citam-se as dos gêneros bacterianos *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (PAHLOW et al., 2003).

### **2.2.2 Enterobactérias**

As enterobactérias são microrganismos gram-negativos, não formadores de esporos e anaeróbios facultativos. No processo de ensilagem estão relacionadas ao consumo inicial de oxigênio, auxiliando no estabelecimento das condições anaeróbias. As enterobactérias fermentam os carboidratos, tendo como subproduto o ácido acético, além de outros compostos. A queda do pH no material ensilado é lenta, aumentando a perda de MS durante o processo, e altas concentrações desse ácido reduzem o consumo da silagem pelos animais. (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

As enterobactérias são inibidas pela redução do pH da massa ensilada, porque o pH ótimo para seu crescimento está entre 6,0 e 7,0, sendo que a maioria das linhagens não se desenvolve em pH abaixo de 5,0. Dessa forma, em condições adequadas para a população de enterobactérias, que normalmente é alta nas forrageiras ensiladas, as quais permanecem ativas apenas durante as primeiras 12 a 24 horas da ensilagem. Após esse período, seu número populacional declina rapidamente (OSTLING; LINDGREN, 1995).

### 2.2.3 Bactérias esporogênicas

As bactérias do gênero *Clostridium* são gram-positivas, esporogênicas, que crescem sob condições estritamente anaeróbias, com algumas exceções aerotolerantes (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). A fermentação clostrídica resulta em perdas significativas de MS e os produtos da fermentação reduzem a palatabilidade, além de diminuir a estabilidade da silagem (ROTZ; MUCK, 1994). A presença de *Clostridium* sp. tem efeito negativo sobre a qualidade da silagem se o pH não for suficientemente baixo para inibir o seu crescimento, pois esses microrganismos fermentam açúcares, ácido lático e aminoácidos, elevando o pH, produzindo ácido butírico e aminas que podem prejudicar a ingestão e a palatabilidade da silagem (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; STEFANIE et al., 2000).

As bactérias do gênero *Bacillus* também são esporogênicas, mas diferentemente dos clostrídios são aeróbias ou aeróbias facultativas. Os *Bacillus* fermentam grande variedade de carboidratos, formando ácidos orgânicos (acético, lático, butírico) e/ou álcoois como etanol, 2,3-butanodiol e glicerol, o que predispõe a silagem à ação de microrganismos deterioradores em condições aeróbias, reduzindo a estabilidade (NOEL; BERKELY, 1986). No entanto, deve-se ressaltar que há algumas espécies de *Bacillus* produtoras de substâncias antifúngicas que têm sido usadas para inibir a deterioração aeróbia da silagem (MORAN; PULLAR, 1993). Basso et al. (2012) relataram que a inoculação de *Bacillus subtilis* na concentração de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônia (UFC)  $\text{g}^{-1}$  de silagem, melhora a estabilidade aeróbia da silagem de milho, de forma a manter os valores de pH mais estáveis na fase de pós-abertura dos silos. As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* que tem sido isoladas de silagens são *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis* e *B. Polymyxa* (GIFFEL et al., 2002).

#### **2.2.4 Principais microrganismos associados à deterioração aeróbia das silagens**

As leveduras são microrganismos eucarióticos, anaeróbios facultativos e heterótrofos e sob condições de anaerobiose fermentam açúcar em etanol, dióxido de carbono e água. Conforme McDonald, Henderson e Heron (1991), as leveduras sobrevivem em condições com baixas concentrações de oxigênio e baixos valores de pH ( $\text{pH} < 4,0$ ). Esses microrganismos são responsáveis pelo início da deterioração aeróbia em silagens (PAHLOW et al., 2003; WOOLFORD, 1990), embora as bactérias ácido acéticas (SPOELSTRA; COURTIN; BEERS, 1988) e outros microrganismos (BERNARDES et al., 2007; LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002) sejam também citados como iniciadores.

As leveduras responsáveis pelo processo de deterioração são classificadas em dois grupos, segundo Jonsson e Pahlow (1984): as espécies que utilizam ácidos orgânicos (gêneros *Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula* e *Pichia*) e as que consomem açúcares (gênero *Torulopsis*). Como resultado do consumo dos carboidratos solúveis e dos ácidos, as leveduras realizam a fermentação alcoólica. A produção de etanol não tem valor preservativo para a silagem, provocando perdas de MS e energia (WOOLFORD, 1984) e podendo causar rejeição de consumo pelo animal (SCHMIDT et al., 2004).

Com o fechamento dos silos e consequente diminuição de oxigênio, as leveduras competem com as BAL pelos açúcares e, nas primeiras semanas de ensilagem, a população de leveduras pode atingir  $10^7$  ufc/g, porém o decréscimo dessa população é iminente em função da concentração de ácidos, pH e anaerobiose (JONSSON; PAHLOW, 1984). Embora a ausência de oxigênio predomine no interior do silo, as áreas superficiais (mais próximas à atmosfera) estão sujeitas ao contato com oxigênio, principalmente em função dos materiais

usados para cobrir os silos. Nessas situações, as leveduras podem multiplicar lentamente durante todo o período da ensilagem e no momento da abertura apresentar contagens acima de 100.000 UFC g<sup>-1</sup> de silagem (BORREANI; TABACCO; COLOMBARI, 2002). A aeração do material na ensilagem impulsiona a multiplicação das leveduras, o que favorece o processo de deterioração após a abertura dos silos, conforme observado por Kung Junior et al. (1998) e Muck (2004) em silagens de milho, nas quais as populações de leveduras foram superiores a 10<sup>5</sup> ufc/g, comprometendo a estabilidade da silagem em poucas horas.

Os fungos filamentosos são microrganismos eucarióticos, quimiorganotróficos, geralmente apresentando exigências simples, sendo a maioria aeróbia (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010). A ocorrência de fungos filamentosos em silagens está associada, principalmente, a falhas na compactação da forrageira, que podem ocorrer em função do teor de MS e tamanho das partículas (MUCK; SHINNERS, 2001). Fatores ambientais também influenciam o crescimento de fungos, como umidade elevada, substrato propício (rico em carboidrato), temperatura adequada, pH superior a 5,0 e ambiente sem circulação constante de ar. Esses microrganismos apresentam alta resistência às variações de pH e alguns sobrevivem em meio microaerofílico. Estes microrganismos são responsáveis por perdas nutricionais, deterioração aeróbica da silagem e produção de micotoxina. A produção de esporos fúngicos facilita a dispersão e contaminação de novos ambientes (DRIEHUIS, 2012).

Os fungos presentes na deterioração da silagem são representados por muitos gêneros, incluindo os tipos termofílicos. Em algumas silagens, o desenvolvimento dos fungos filamentosos segue o das leveduras e isso frequentemente é refletido no aparecimento de picos de elevação da temperatura durante a deterioração. Um grande número de espécies tem sido isoladas de silagens deterioradas, incluindo espécies dos gêneros *Monascus*, *Geotrichum*,

*Bissochlamys*, *Mucor*, *Monilia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Segundo Driehuis, Oude-Elferink e Wikselaar (2011), as micotoxinas encontradas na silagem de milho e de culturas de clima temperado podem ser produzidas antes ou depois da ensilagem. No primeiro caso, as micotoxinas são produzidas por fungos que infectaram a cultura vegetal ainda em desenvolvimento no campo ou por fungos endofíticos que viviam associados às plantas. As principais micotoxinas decorrentes dessa situação são tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e aflatoxinas. Micotoxinas encontradas após a ensilagem podem ainda estar relacionadas a fungos que desenvolveram durante o processo de ensilagem, normalmente devido decorrentes de práticas inadequadas na condução do processo. Os principais fungos encontrados nesse caso são *Penicillium roqueforti*, *P. paneum* e *Aspergillus fumigatus*. É importante determinar em que momento as micotoxinas encontradas na silagem são produzidas para distinguir os diferentes tipos de fungos, micotoxinas e fatores agrícolas que estão envolvidos e que influenciarão os níveis de micotoxinas (DRIEHUIS, 2011).

Mallmann (2012) ressalta que a produção de toxinas é específica para cada fungo, requerendo condições específicas de umidade, temperatura, substrato e oxigênio apropriado. Como exemplo, o *Fusarium sporotrichioides* produz uma toxina sob condições de baixa temperatura, enquanto o *Aspergillus flavus* tem a habilidade de produzir toxinas a uma temperatura de 25°C e até mesmo sob condições desfavoráveis.

Além das leveduras e fungos filamentosos, as bactérias do ácido acético (gram-negativas e catalase positiva) são conhecidas por atuarem no início da deterioração aeróbia da silagem (NISHINO, 2011). Espécies isoladas de silagens de milho pertencem ao gênero *Acetobacter*, mas sabe-se que outros 10 gêneros são também conhecidos como membros da família das bactérias do ácido acético

(YAMADA; YUKPHAN, 2008). A oxidação de etanol para ácido acético por essas bactérias é bem conhecida e ainda é válido ressaltar que as bactérias do ácido acético são capazes também de promoverem a oxidação de ácidos láctico e acético para CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Spoelstra, Courtin e Beers (1988) observaram a oxidação de etanol a ácido acético da silagem de milho por bactérias do ácido acético na ausência e presença de leveduras, comprovando, dessa forma, que essas bactérias podem, sozinhas, serem as responsáveis pela iniciação da deterioração aeróbia da silagem. Embora já se saiba que as bactérias do ácido acético estejam envolvidas com a deterioração aeróbia das silagens, poucos estudos vêm sendo conduzidos para maiores entendimentos sobre a atividade dessas bactérias em diferentes tipos de culturas para ensilagem. Em silagens de milho, essas foram isoladas e caracterizadas como iniciadoras do processo de deterioração aeróbica (MUCK, 2012). Por outro lado em silagem de cana-de-açúcar, especula-se um efeito benéfico dessas bactérias, convertendo parte do etanol em ácido acético e inibindo leveduras (NISHINO, 2011).

### **2.3 Inoculantes**

Vários aditivos têm sido desenvolvidos com o objetivo de melhorar o padrão de fermentação e a estabilidade aeróbia das silagens, controlando o crescimento de microrganismos deterioradores com conseqüente diminuição de perdas de energia do alimento e ganho no desempenho animal. Os aditivos, no entanto, devem ser seguros, fáceis de manusear, além de economicamente viáveis. Os aditivos podem ser classificados como químicos ou microbianos. E, também chamados de inoculantes, que, aliás, tornaram-se o tipo de aditivo mais utilizado nas silagens em muito países (HENDERSON, 1993).

A maioria desses produtos eram compostos de BAL homofermentativas (diversas espécies de *Pediococcus* e *Enterococcus faecium*) ou

heterofermentativas facultativas (*L. plantarum*, *L. casei*). Espera-se, com o uso dessas espécies, uma rápida e eficiente fermentação, como consequência de uma grande produção de ácido láctico, seguida de redução de pH e, assim, as perdas de MS e a produção de efluentes da forrageira seriam minimizadas e o valor nutritivo conservado de forma semelhante à forrageira fresca (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; MUCK, 2012). Os inoculantes microbianos ainda visam melhorar o desempenho animal: produção de leite, ganho de peso, eficiência na alimentação (WEINBERG; MUCK, 1996).

No entanto, foi observado que os inoculantes compostos de cepas bacterianas homofermentativas apresentavam efeitos variáveis sobre a população de leveduras e negativos sobre a estabilidade aeróbia de silagens de milho e de pequenos grãos, possivelmente em função da diminuição do ácido acético (DRIEHUIS; WIKSELAAR, 2000; HIGGINBOTHAM et al., 1998).

No final de 1990, uma nova classe de inoculantes, composta por bactérias heterofermentativas obrigatórias, tais como *L. buchneri*, entraram no mercado. Essas cepas crescem lentamente, mesmo após o período de fermentação ativa, com capacidade para converter o ácido láctico e açúcares em ácido acético 1,2 propanodiol, ácido propiônico, dióxido de carbono e traços de etanol (OUDE-ELFERINK et al., 2001). Dessa forma, esses microrganismos, em geral, produzem maiores concentrações de ácido acético comparados às bactérias heterofermentativas facultativas, inibindo o crescimento de levedura e fungos e conseqüentemente a estabilidade aeróbia é aumentada.

Atualmente, existe no mercado uma terceira classe de inoculantes, que é composta de uma combinação de cepas de *L. buchneri* e de linhagens mais tradicionais. O intuito dessa combinação de bactérias é aumentar a recuperação de MS, maximizar o desempenho animal e melhorar a estabilidade aeróbia. Como exemplo, os inoculantes bacterianos podem ser compostos por *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus*

*buchneri*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus* spp., *Streptococcus faecium*, *Streptococcus faecalis* e propionibactérias, e de complexos enzimáticos compostos por hemicelulase, celulase, amilase,  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -mananase (BERNARDES; REIS; MOREIRA, 2005; JOBIM; GONÇALVES, 2003; KUNG JUNIOR et al., 2007; RODRIGUES et al., 2004).

Alguns autores afirmam que o crescimento das cepas bacterianas e o sucesso no processo fermentativo nos silos podem ser explicados pelo rápido crescimento e competição com as bactérias epifíticas por carboidratos presentes na planta (MUCK, 2012). Algumas cepas podem também produzir compostos antimicrobianos, inibindo microrganismos patogênicos e deterioradores. Basso et al. (2012) relataram que a inoculação de *Bacillus subtilis* controla o crescimento de microrganismos deterioradores. Gollop, Zakin e Weinberg (2005), Marcinakova et al. (2008) e Ratanapibulsawat et al. (2005) isolaram cepas de BAL a partir de silagem e essas apresentavam atividade inibitória contra uma variedade de espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Bacillus* sp., *Listeria* sp. e *Escherichia coli*. Existem também evidências de que algumas BAL produzem compostos antifúngicos (BROBERG et al., 2007).

Diversos estudos analisaram os perfis fermentativos de silagens inoculadas com *Lactobacillus plantarum* e verificaram uma rápida elevação do número desses microrganismos, elevada produção de ácido lático, rápido declínio do pH e consumo de carboidratos solúveis, em três a sete dias de fermentação (BOLSEN; WILKINSON; LIN, 2000; KUNG JUNIOR et al., 2007). Da mesma forma, Kung Junior (2009), Taylor e Kung Junior (2002) e Weinberg et al. (1999) observaram que a adição do *Lactobacillus buchneri* 40788 melhorou a estabilidade aeróbia, aumentando a concentração de ácido acético e diminuindo as populações fúngicas.

A estabilidade aeróbia da silagem pode ser definida como a resistência da massa de forragem à degradação, após abertura do silo. Alguns autores a definem como sendo o tempo transcorrido para que a silagem atinja temperatura superior a 2°C acima da temperatura ambiente (TAYLOR; KUNG JUNIOR, 2002). A estabilidade da silagem é determinada pela fermentação aeróbia (pós-fermentação) que ocorre após a abertura do silo. Para solucionar a deterioração da silagem torna-se necessário o uso de aditivos químicos ou microbiológicos (NISHINO et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2007).

A utilização de inoculantes contendo BAL, além de melhorar a qualidade da fermentação, pode trazer outros benefícios. Bolsen, Wilkinson e Lin (2000) e Kung Junior e Ranjit (2001) relataram melhoria do valor nutricional de silagens inoculadas com diferentes cepas de bactérias, proporcionando uma redução da fração fibrosa em relação às silagens não inoculadas. Quando a silagem inoculada é fornecida aos animais, ela pode produzir um efeito positivo, como aumento no ganho de peso e maior produção de leite (KUNG JUNIOR; MUCK, 1997). A causa dessa melhoria no desempenho não é clara, no entanto estudos *in vitro* sugerem que as silagens inoculadas melhoraram o crescimento microbiano no rúmen, o que tem sido observado mesmo quando os inoculantes tiveram pouco efeito sobre a qualidade da fermentação da silagem (MUCK, 2004).

Apesar da maioria dos trabalhos recomendarem a utilização de inoculantes em silagem por proporcionarem algum benefício, existem ainda dados contraditórios (KLEINSCHMIT; KUNG JUNIOR, 2006; PEREIRA; ROCHA; FERREIRA, 2007; ROCHA et al., 2006; ZOPOLLATO; DANIEL; NUSSIO, 2009). Pereira, Rocha e Ferreira (2007) e Rocha et al. (2006), avaliando silagens de gramíneas tropicais, não observaram diferenças significativas entre silagens com e sem inoculante: não foi observada eficiência

dos inoculantes para melhorar o padrão fermentativo e sobre os valores nutricionais das silagens.

#### **2.4 Inoculantes para silagem de milho**

Embora as grandes empresas produtoras de inoculantes estejam localizadas na Europa e América do Norte, países da Ásia, América do Sul e África têm realizado muitas pesquisas sobre inoculantes para aplicação em gramíneas tropicais, uma vez que produtos desenvolvidos para gramíneas de estação fria podem não ser tão eficazes quando usados em gramíneas e leguminosas tropicais. A qualidade da silagem depende, basicamente, do material ensilado e do tipo de microrganismo que atuará durante o processo de fermentação e após a abertura dos silos (JOBIM et al., 1997).

A escolha de um inoculante deve ser baseada em critérios que considerem aspectos relacionados à forrageira em questão e ao objetivo a ser alcançado. Os microrganismos homofermentativos caracterizam-se pela taxa de fermentação mais rápida, atingem esse objetivo através da diminuição do pH, menor proteólise, maior concentração de ácido lático, menores teores de ácidos acético e butírico, menor teor de etanol e maior recuperação de energia e MS. Bactérias heterofermentativas utilizam ácido lático e glicose como substrato para produção dos ácidos acético e propiônico, os quais são efetivos no controle de fungos, sob baixo pH (ZOPOLLATTO; DANIEL; NUSSIO, 2009). Logo, para melhorar a qualidade da silagem, as BAL homofermentativas são a melhor opção e caso o objetivo seja melhorar a estabilidade aeróbia, as cepas heterofermentativas devem ser usadas e a combinação das cepas selecionadas confere potenciais vantagens (LAURIAULT et al., 2009).

Entretanto, são apontadas algumas hipóteses para o insucesso da utilização de inoculantes em silagens. Dentre elas, destacam-se a atividade

competitiva da população epífita da planta originada a partir de cepas selvagens, o baixo teor de açúcares da forragem, o excesso de oxigênio, os extremos de atividade de água na massa ensilada, e os problemas na aplicação do produto (KUNG JUNIOR; STOKES; LIN, 2003).

A falta de efetividade dos inoculantes também pode ser em função das cepas presentes nos inoculantes, existindo a necessidade da compatibilidade com a forrageira e os processos fermentativos. Ávila et al. (2010) observaram que cepas da mesma espécie, porém isoladas de diferentes ambientes, podem atuar de forma distinta ao longo da ensilagem. Hill (1989) verificou que quando três “linhagens” de *Lactobacillus plantarum* isoladas de milho, sorgo e alfafa, foram juntamente inoculadas em cada planta, a “linhagem” dominante em cada silagem foi a natural de cada planta. Assim, a aplicação de aditivos microbiológicos a partir de bactérias da própria planta a qual se deseja ensilar deve ser levada em consideração para um bom desempenho do aditivo, ou seja, um inoculante desenvolvido para determinada forrageira não necessariamente terá o mesmo efeito em outras espécies de plantas ensiladas. Corroborando essa afirmação, Ávila et al. (2009, 2010, 2012) verificaram que cepas de *Lactobacillus* originadas da silagem de cana-de-açúcar foram eficientes em aumentar as produções dos ácidos acético e propiônico, reduzir a concentração de etanol e contagens de leveduras, melhorando a estabilidade aeróbia em silagens de cana-de-açúcar. Esses autores também verificaram que a adição de cepas de BAL, selecionadas a partir da silagem de cana-de-açúcar, promoveu maior produção de ácido acético na silagem inoculada com o *L. plantarum* isolado a partir da cana, em comparação às silagens inoculadas com um produto comercial que continha a cepa *L. plantarum*, confirmando a existência de diferenças entre as estirpes da mesma espécie bacteriana (ÁVILA et al., 2009, 2010).

Outros trabalhos foram conduzidos, buscando-se selecionar microrganismos eficientes para inocular diferentes tipos de forrageiras para

ensilagem. Saarisalo, Skytta e Haikara (2007) isolaram cepas homofermentativas com propriedades antimicrobianas para ensilagem de gramínea temperadas; Marcinakova et al. (2008) pesquisaram e isolaram cepas de *Enterococcus faecium* com potencial inoculante, uma vez que produziam bacteriocina; Banemann et al. (2010) investigaram o potencial de um inoculante para aumentar a produção de metano a partir de silagem de milho; Pasebani et al. (2011) investigaram inoculantes em silagens de *Panicum maximum*, com a finalidade de reduzir pH, amônia, fibra.

A inoculação da silagem de milho é justificável por alguns motivos, principalmente porque acelera o tempo de conclusão da fermentação, causando redução das perdas de nutrientes (JOBIM et al., 1997). É justificável também em função da alta concentração de grãos e dos altos teores de carboidratos solúveis, visando, assim, assegurar uma maior preservação da massa ensilada por meio da solubilização tardia de alguns substratos que estão diretamente relacionados à adequada manutenção do meio (por exemplo pH) e dos microrganismos desejáveis (KUNG JUNIOR; SHAVER, 2001). Entretanto, relatos na literatura afirmam que não é necessário o uso de aditivos para o estímulo da fermentação em silagem de milho (AMARAL; BERNARDES, 2013), desde que a planta se encontre no ponto de colheita, com teor MS entre 25 e 30% e apresente uma população epifítica de *Lactobacillus*, os quais inibem os processos fermentativos indesejáveis. Por outro lado, a utilização de aditivos seria necessária, e sua ação mais eficaz, quando a planta ensilada não é de boa qualidade ou quando ocorrem falhas no processo de ensilagem, ou de retirada da forragem após a abertura dos silos. Com isso, nos últimos anos tem crescido o interesse em selecionar cepas adequadas a determinados grupos de forrageiras, como o milho, que tenham melhor efeito sobre os processos de fermentação (SAARISALO; SKYTТА; HAIKARA, 2007).

Os microrganismos presentes nos inoculantes devem ser aplicados em doses suficientes para dominar de forma eficaz a fermentação, ou seja, a quantidade de inoculante deve ser utilizada para obtenção de efeitos consistentes. As doses de BAL também têm sido objetivos de diversos estudos, a fim de se obter melhor relação custo benefício na produção de silagem. Alguns pesquisadores propõem um mínimo de  $10^5$  unidades UFC por grama de forragem fresca e um nível preferível de  $10^6$  (KUNG JUNIOR; SHAVER, 2001). Observa-se que os relatos na literatura são bastante diversos quanto à população a ser inoculada mais eficiente para o processo fermentativo, sendo que alguns trabalhos relatam diferenças entre doses quando em outros não são detectadas essas diferenças.

Em estudos conduzidos por Filya, Sucu e Karabulut (2006) com diferentes doses de *L. buchneri* ( $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC/g) em silagens de milho, os autores não verificaram diferenças significativas entre os teores de MS com o aumento das doses de *L. buchneri* em silagens de milho. Ranjit, Taylor e Kung Junior (2002) não encontraram diferenças significativas na recuperação de MS com o aumento de doses de *L. buchneri* ( $1 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$ ;  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC/g) em silagens de milho.

Basso et al. (2012) relataram que doses de *L. buchneri* maiores que  $10^5$  UFC/g em silagens de milho proporcionaram maior redução da contagem de leveduras e maiores concentrações de ácido acético. Kleinschmit e Kung Junior (2006), Kleinschmit, Schmidt e Kung Junior (2005) e Nishino et al. (2003), verificaram aumento na estabilidade de silagens de milho inoculadas com populações maiores ou igual  $1 \times 10^6$  UFC/g of *L. buchneri*. Ranjit, Taylor e Kung Junior (2002) e Taylor e Kung Junior (2002) e, a inoculação com *L. buchneri* mostra maior efetividade com inoculação superior a  $5 \times 10^5$  UFC/g. Reis et al. (2008), avaliando o efeito do *L. buchneri* nas silagens de grãos úmidos de milho ( $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  UFC/g de massa ensilada), observaram que a

inoculação da silagem com  $1 \times 10^5$  UFC/g de *L. buchneri* mostrou-se eficaz no controle de leveduras e fungos e promoveu aumento na estabilidade aeróbia. Diante desse resultado, obtido os autores, ressaltam que não há necessidade de populações inoculadas superiores à supracitada, considerando-se a relação custo-benefício.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Preparo dos inoculantes

As cepas bacterianas utilizadas no experimento consistiram de 8 cepas isoladas da silagem de cana-de-açúcar e a cepa presente no inoculante comercial Lalsil Cana (Matsuda e Lallemand® S) que se encontravam armazenadas em criotubos a 80°C negativos. Todas as cepas foram reativadas conforme Ávila et al. (2009). Inicialmente, foram cultivadas em tubos contendo 2 ml de caldo *MRS* por 24 horas, a 30°C. Em seguida, foram transferidas para tubos contendo 10 ml de caldo *MRS* e incubadas, por mais 24 horas, e, finalmente, transferidas para frascos *Erlenmeyers* contendo 250 ml de caldo *MRS* e novamente incubadas, por 24 horas, a 30°C. Após esse período de incubação, foi feita a contagem do número de células, obtendo-se resultado de 9 log UFC mL<sup>-1</sup> do caldo.

##### 3.1.1 Preparo do milho para ensilagem

A época de colheita do milho foi determinada seguindo-se o critério de acompanhamento visual da evolução da linha de leite nos grãos centrais das espigas com mais de 1/3 do grão (CRUZ et al., 2005). A colheita foi realizada com colhedora automotriz, com tamanho da partícula regulado para 10 mm. A forrageira foi levada para um galpão para aplicação dos inoculantes e confecção das silagens.

### **3.1.2 Preparo da silagem de milho e formação dos tratamentos**

Após o período de incubação os inoculantes foram adicionados a uma concentração de  $9 \log \text{ UFC Kg}^{-1}$  de forragem e para execução do trabalhos foram retiradas foram retirados 3 ml e 30 ml do caldo presente no *Erlenmeyer*, o que corresponde a  $5 \log \text{ UFC g}^{-1}$  e  $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$  de forragem, respectivamente. Posteriormente, foram misturados com 80 ml de água destilada e homogeneizada com 3 Kg de forragem a ser ensilada.

A forragem foi ensilada em silos experimentais de PVC com 10 cm de diâmetro e 80 cm de altura, adaptados com válvula tipo Bunsen, com capacidade para aproximadamente, 2,5 a 3 Kg de silagem, sendo utilizada uma densidade de compactação dos silos de, aproximadamente, 600 Kg de forragem por  $\text{m}^3$ . A forragem foi compactada manualmente nos silos, com ajuda de barras de ferro. Em seguida os silos foram fechados, pesados e armazenados em local coberto.

### **3.2 Avaliação das características químicas e microbiológicas das silagens**

Foram retiradas duas amostras de cada tratamento da forrageira antes da ensilagem e após abertura dos silos aos 30 e 90 dias de fermentação, sendo uma delas pesada e congelada para posteriores análises químico-bromatológicas e a outra foi imediatamente encaminhada ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para avaliação da população de microrganismos.

### 3.2.1 Análises químico-bromatológicas

As análises bromatológicas da forrageira fresca e dos diferentes tratamentos após o período de fermentação foram realizadas no Laboratório de Análise de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia e também no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia, ambos da UFPA.

As amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas, conforme metodologia recomendada pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1990). Decorrido o tempo de secagem, as amostras foram novamente pesadas e moídas em moinho do tipo *Wiley*, com peneira de malha de 1 mm e, após o processamento, foram acondicionadas em potes plásticos devidamente identificados para posteriores análises. A determinação de PB foi realizada conforme AOAC (1990). Para a avaliação da matéria seca (MS), as amostras foram acondicionadas em estufas, a 105°C, por 24 horas (AOAC, 1990). A determinação de fibra em detergente neutro (FDN) foi realizada usando o sistema, denominado ANKOM (*ANKOM® Technology Corporation, Fairport, NY*) e descrito por Holden (1999). A análise dos carboidratos solúveis foi realizada pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956), com algumas modificações conforme Santos (2012).

A determinação do pH foi realizada com os mesmos extratos para realização das análises microbiológicas (foram diluídas 25 g de silagem fresca de cada amostra em 225 ml de água peptonada estéril, 0,1%) por meio da leitura em potenciômetro digital (Digimed Analítica, modelo DM 20®), segundo metodologia de Cherney e Cherney (2003).

As determinações de etanol, ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico foram realizadas retirando-se uma porção de 2 ml do extrato descrito acima e acidificado com 10 µl de ácido sulfúrico, na concentração de 50% (v/v), para assegurar o pH final entre 2 e 3 (CARVALHO et al., 2012). As

amostras em triplicata, após serem acidificadas, foram centrifugadas, filtradas e congeladas para posteriores análises dos ácidos e álcoois por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os ácidos e etanol foram identificados e suas concentrações foram determinadas por comparação dos tempos de retenção equivalentes aos padrões conhecidos. O cromatógrafo utilizado foi um *Shimadzu* (*Shimadzu Corporation*, modelo LC-10Ai; Tokyo, Japão) equipado com um sistema de detecção duplo composto por um detector de radiação ultravioleta (UV) e um detector de índice de refração (RID; 10A SPD-10Ai). Foi utilizada uma coluna de exclusão iônica da *Shimadzu* (Shim-pack SCR-101H; 7,9 milímetros x 30 cm) e temperatura de operação igual a 30 °C para a separação cromatográfica. A fase móvel consistiu de uma solução de ácido perclórico 100 mM com uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Os ácidos foram detectados por absorvância UV (210 nm) e o etanol foi identificado pelo o detector de índice de refração.

### 3.2.2 Avaliação das perdas de matéria seca

Os silos foram avaliados quanto às perdas de MS total. Para tanto, o peso dos silos e de seus componentes individuais foram previamente determinados, possibilitando, dessa forma, os cálculos de perdas. Na abertura, foram anotados os pesos dos silos com a forrageira. O conjunto do silo laboratorial sem a forrageira era constituído por tampa, válvula e borracha de vedação, telas inferior e superior e espaçadores. Para determinação das perdas de MS, utilizou-se a equação descrita a seguir, segundo Jobim et al. (2007):

$$PMS = 100 - (MF_{ab} \times MS_{ab}) / (MF_{fe} \times MS_{fe}) * 100$$

Em que:

PMS = % de perdas de matéria seca;

MF<sub>ab</sub> = massa da forragem na abertura;

MSab = teor de matéria seca da forragem;

MFfe = massa da forragem no fechamento;

MSfe = teor de matéria seca da forragem no fechamento.

### 3.2.3 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas da forragem fresca e das silagens foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFLA. Amostras de 25 g foram diluídas em 225 mL de água peptonada estéril (0,1%) e agitadas durante 20 minutos, a 120 rpm, em agitador orbital (*Shaker*). A partir do extrato, foram preparadas diluições decimais em série ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) e dessas diluições foram tomadas uma alíquota de 0,1 ml de cada diluição, em triplicata, espalhado com alça de *Drigalsky* nos meios adequados para grupo de microrganismos a serem avaliados.

A contagem de BAL foi realizada em meio *MRS (De Man Rogosa Sharpe - Difco)*, acrescido de nistatina (0,4%), pelo método de espalhamento em superfície, segundo Ávila et al. (2009). Em seguida a incubação foi realizada a 30°C e a contagem total foi realizada após 48 horas.

A quantificação de leveduras e fungos filamentosos, foi realizada em meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), também pelo método de espalhamento em superfície, segundo Ávila et al. (2009). Posteriormente, a incubação foi realizada, a 28°C, por 48 e 120 horas para contagens de leveduras e fungos filamentosos, respectivamente. Para realizar a quantificação desses microrganismos foram observadas as características macroscópicas da morfologia das colônias, sabendo-se que as leveduras são colônias unicelulares, enquanto os fungos são multicelulares filamentosos e em caso de subjetividade para diferenciar as colônias foram realizadas preparações microscópicas.

### 3.3 Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens

Nos dois períodos de abertura dos silos (30 e 90 dias), foram retiradas amostras para avaliação da estabilidade aeróbia. Amostras de 2,3 kg de silagem, referentes a cada tratamento, foram colocadas em baldes plásticos, transferidas para salas com ambiente controlado ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ). No centro de cada balde foram inseridos *dataloggers* (IMPAC, modelo MI-IN-D-2-L) para avaliação da temperatura, no momento da abertura dos silos e a cada 30 minutos, durante sete dias de aerobiose. A temperatura do ambiente foi monitorada também por meio de *Dataloggers*. A temperatura máxima ( $T_m$ ) e o tempo necessário para alcançar essa temperatura (TTMAX), para cada amostra de silagem foi calculada a partir dos valores de temperatura obtidos com os *Dataloggers*. A estabilidade aeróbia foi calculada como o tempo observado para que a silagem apresentasse elevação de  $2^\circ\text{C}$  em relação à temperatura ambiente, após a abertura do silo (KUNG JÚNIOR; STOKES; LIN, 2003).

### 3.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

Para avaliação das características fermentativas e estabilidade aeróbia, utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso (DBC), com três repetições, sendo os blocos, os dias de confecção da silagem de milho. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial do tipo  $(9 \times 2 \times 2)$ , sendo 9 cepas (UFLA SIL 1, UFLA SIL 2, UFLA SIL 3, UFLA SIL 4, UFLA SIL 5, UFLA SIL 6, UFLA SIL 7, UFLA SIL 8 e Lalsil), em duas doses do inoculante (5 e 6 log UFC  $\text{g}^{-1}$  de forragem) e em dois tempos de abertura dos silos (30 e 90 dias) com 3 repetições, totalizando 108 unidades experimentais.

Os dados foram submetidos às análises de variância e suas médias foram comparadas por meio de teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade, utilizando o pacote estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Características das cepas utilizadas como inoculantes

Os inoculantes utilizados pertencem a três espécies diferentes *Lactobacillus plantarum*, *L. buchneri* e *L. hilgardii* (Tabela 1). A espécie *L. plantarum* é uma espécie heterofermentativa facultativa, enquanto as espécies *L. buchneri* e *L. hilgardii* são heterofermentativas obrigatórias. A espécie *L. plantarum* tem sido utilizada em silagens há muitos anos, geralmente resultando em silagens com quantidades elevadas de ácido lático, menores teores de ácido acético, maiores contagens de leveduras e produção de etanol, resultando em silagens menos estáveis após a abertura dos silos (ÁVILA et al., 2010; NISHINO et al., 2011). Em geral silagens inoculadas com *L. buchneri* têm como características altas concentrações de ácido acético, o qual é mais eficiente em inibir microrganismos deterioradores como leveduras e fungos filamentosos, melhorando, assim, a estabilidade aeróbia das silagens (FILYA; SUCU, 2010). A espécie *L. hilgardii* apresenta metabolismo semelhante ao de *L. buchneri*, com capacidade de degradar o ácido lático a ácido acético e 1,2 propanodiol sob condições de baixa concentração de oxigênio, porém foi relatada maior síntese de ácido propiônico. A espécie *L. hilgardii* não havia sido testada em milho, em trabalhos anteriores.

Tabela 1 Identificação molecular das cepas de bactérias do ácido lático (BAL) estudadas

Cepas	Espécie	Código NCBI	% de identificação
UFLA SIL 01	<i>Lactobacillus buchneri</i>	HM162412.1	98
UFLA SIL 02	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HM218291.1	99
UFLA SIL 03	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HM218291.1	98
UFLA SIL 04	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HM218291.1	99
UFLA SIL 05	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	HM217953.1	98
UFLA SIL 06	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	HM217953.1	98
UFLA SIL 07	<i>Lactobacillus buchneri</i>	HQ711363.1	98
UFLA SIL 08	<i>Lactobacillus buchneri</i>	CP002652.1	98
Lalsil	<i>Lactobacillus buchneri</i>	-	-

#### 4.2 Composições química e microbiológica da planta do milho

O teor de MS da planta de milho antes da ensilagem foi igual a 303,8 g kg<sup>-1</sup> e se insere dentro do intervalo de 300 a 350 g kg<sup>-1</sup> forrageira, sugerido por Neumann (2013) como ideal para o processo da ensilagem (Tabela 2). Segundo McDonald, Henderson e Heron (1991), valores de MS acima de 25% em relação ao peso fresco são preconizados como condição necessária para que as perdas de efluentes dentro do silo sejam minimizadas e, conseqüentemente, ocorra a manutenção dos nutrientes do material ensilado. Por outro lado, o teor de carboidratos solúveis em água (CHO) foi inferior ao valor recomendado (60 g kg<sup>-1</sup> MS) para uma fermentação eficiente, segundo Jaakkola, Huhtanem e Hissa (1991). A concentração de FDN (537,4 g kg<sup>-1</sup> MS) foi compatível aos valores encontrados na literatura (NEUMANN, 2013; VALADARES FILHO et al., 2006).

As populações de bactérias lácticas (BAL), leveduras e fungos filamentosos na forrageira fresca foram inferiores aos valores reportados em outros trabalhos (BASSO et al., 2012; FILYA, 2003; FILYA; SUCU;

KARABULUT, 2006; SANTOS, 2012). Sabe-se que o número de bactérias láticas epifíticas é usualmente baixo no momento que precede a ensilagem, sendo a população elevada no decorrer do processo (LIN; BOLSEN; BRENT, 1992). Essa variação no número de BAL na forrageira a ser ensilada pode ser atribuída a diversos fatores, tais como temperatura, radiação ultravioleta e fatores associados à própria forrageira (MERRY et al., 2008). Da mesma forma, os números de leveduras e fungos filamentosos podem ser variáveis, uma vez que também fazem parte da população epifítica da forrageira (MUCK, 2010). Os valores referentes às contagens de leveduras e fungos filamentosos na cultura antes da ensilagem são inferiores aos valores relatados por Basso et al. (2012) (7,23 e 5,63 log UFC g<sup>-1</sup> de forragem); Kung Junior et al. (2010) (5,69 e 5,05 log UFC g<sup>-1</sup> de forragem),

O valor de pH determinado na planta do milho no momento da ensilagem, foi igual a 4,78. Esse valor foi ligeiramente inferior aos encontrados também em planta inteira de milho, em outros trabalhos, por exemplo 5,73 (KLEINSCHMIT; KUNG JUNIOR, 2006); 5,94 (FILYA; SUCU; KARABULUT, 2006); 5,86 (FILYA, 2003); 5,87 (DRIEHUIS et al., 1999).

Tabela 2 Composição química e microbiológica do milho antes da ensilagem

Variável	Média	Desvio Padrão
Matéria Seca (g Kg <sup>-1</sup> MF)	303,8	0,82
Concentração (g Kg <sup>-1</sup> MS)		
Carboidratos solúveis em água	11,57	1,67
Fibra em detergente neutro	537,4	2,82
Proteína bruta	71,97	1,69
Contagem (log UFC g <sup>-1</sup> forragem)		
BAL	5,79	1,13
Leveduras	2,74	2,81
Fungos Filamentosos	2,09	2,11
pH	4,78	0,42

MF: matéria fresca

### 4.3 Características das silagens

Não foram constatados efeitos significativos ( $p > 0,05$ ) dos fatores silagens, doses do inoculante e tempo de fermentação e de suas interações sobre os teores de MS e de carboidratos solúveis (Tabela 2). O teor médio de MS das silagens foi igual a  $287,5 \text{ g kg}^{-1}$ , independente do inoculante e dose aplicada. Representando perda de MS (6,75%) proporcionada pelo tempo de fermentação. Jatkauskas e Vrotniakienė (2005) e Wittenberg, Ingalls e Devlin (1983) observaram perdas maiores de MS (9,89 e 9,2%, respectivamente) em silagens de milho inoculadas com BAL heterofermentativas. Filya e Sucu (2010) verificaram perdas distintas de MS em silagem de milho em função do perfil da cepa inoculada, havendo maior perda de MS quando o inoculante foi *L. buchneri* (7,8%) comparado ao inoculante *L. plantarum* (3,6%).

As perdas de MS podem estar relacionadas à diminuição do conteúdo celular, principalmente de carboidratos solúveis, durante o processo fermentativo (SOEST, 1994). Outras vias comuns de perdas são a produção de água resultante de reações metabólicas e a perda de compostos voláteis (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Estes últimos autores afirmam ainda que o conteúdo de MS, tipo de silo, nível de compactação no silo e pré-tratamentos como a adição de inoculantes ou outros aditivos são fatores que influenciam as perdas de efluentes, o que não foi observado no presente estudo. As perdas de MS em geral são maiores no início do processo de fermentação, quando a atividade dos microrganismos é mais intensa. Neste trabalho, observou-se tendência ( $P=0,08$ ) do efeito do fator tempo (Tabela 3), com aumento médio das perdas de 6,03% para silagens com 30 dias de fermentação para 7,43% para silagens com 90 dias de fermentação.

A média dos teores de CHO (12,34 g kg<sup>-1</sup> de MS), encontrada neste trabalho, foi menor em relação à registrada por Basso et al. (2012), apontando a eficiência das cepas de BAL inoculadas em utilizar os CHO durante a fermentação da silagem. No entanto, é oportuno salientar que com a inoculação de 5 log UFC g<sup>-1</sup> a cepa UFLA SIL 2 (*L. plantarum*) apresentou a menor média de CHO (10,48 g kg<sup>-1</sup> de MS), ainda que não tenha se diferenciado estatisticamente dos demais tratamentos. O melhor desempenho quanto à utilização de CHO pode ser atribuído ao perfil metabólico das BAL heterofermentativas facultativas, que fermentam açúcares, seguida de síntese de lactato, acetato e manitol, além de CO<sub>2</sub> e água. As cepas heterofermentativas obrigatórias, como as UFLA SIL 5 e 9 (*L. hilgardii* e Lalsil), apresentaram menor desempenho para utilização de CHO, sendo responsáveis pelas maiores médias de CHO apresentadas no presente trabalho (14,33 e 13,83 g kg<sup>-1</sup> MS). Diferentemente das heterofermentativas facultativas, as heterofermentativas obrigatórias fermentam ácido lático. Vale ainda ressaltar que, a capacidade dos microrganismos em utilizar os carboidratos pode variar em nível intraespecífico, ou seja, diferentes cepas das mesmas espécies de bactérias podem agir de forma diferente durante o processo fermentativo, o que indica que a escolha de cepas para serem utilizadas como inoculantes em silagem é fator essencial. Os carboidratos residuais podem atuar como substratos para microrganismos deterioradores, como leveduras e fungos filamentosos, tornando a silagens susceptíveis à deterioração após a abertura dos silos. Com o uso de inoculantes esse problema pode ser contornado.

Não foram constatados efeitos significativos ( $p > 0,05$ ) dos fatores silagens, doses do inoculante e de suas interações sobre os teores de PB (Tabela 2). O teor médio de PB das silagens foi igual a 76,98 g kg<sup>-1</sup> na MS, independente do inoculante e dose aplicada. Entretanto, na forragem antes da ensilagem foi verificada uma média de PB de 71,97 g kg<sup>-1</sup> na MS, e aos 30 e 90 dias foram

registradas as respectivas médias 76,96 e 77,56 g kg<sup>-1</sup> na MS. Houve aumento de PB em relação à forragem fresca, já entre os períodos de análise 30 e 90 não houve diferença significativa. Esse aumento pode estar relacionado à síntese de proteína microbiana (BOLSEN, 1995). Conforme observado não foi verificada diminuição dos teores de PB, indicando que a proteólise não se estendeu durante a fermentação. A proteólise ocorre quando as condições não são suficientes para eliminar os microrganismos indesejáveis (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Tabela 3 Probabilidade dos efeitos (p) e valores médios da composição bromatológica das silagens de milho

Variável	Média	Tratamento (TRAT)	Dose (D)	Tempo (T)	TRATxD	TRATxT	DxT	TRATxDxT
MS (g Kg <sup>-1</sup> MF)	287,5	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Perdas de MS (%)	6,75	NS	NS	0,08	NS	NS	NS	NS
CHO (g Kg <sup>-1</sup> MS)	12,34	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
FDN (g Kg <sup>-1</sup> MS)	523,7	NS	0,09	NS	NS	NS	NS	NS
PB(g kg <sup>-1</sup> MS)	76,90	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

MS: matéria seca; MF: matéria fresca; CHO: carboidratos solúveis; FDN: fibra em detergente neutro; PB: proteína bruta; NS: não significativo; TRATxD: interação entre tratamento e dose; TRATxT: interação entre tratamento e tempo; DxT: interação entre dose e tempo; TRATxDxT: interação entre tratamento, dose e tempo

A ausência de efeito da inoculação de cepas de BAL sobre FDN em silagem de milho também foi verificada por Gimenez et al. (2006). No presente trabalho, verificou-se tendência ( $P = 0,09$ ) do efeito das dosagens de inoculação (5 e 6 log UFC g<sup>-1</sup>) sobre os teores de FDN. A menor dose de inoculação proporcionou o menor teor médio de FDN (518,8 g kg<sup>-1</sup> de MS) em relação à silagem com maior dose (528,7 g kg<sup>-1</sup> de MS). Bactérias do ácido lático não hidrolisam celulose e, dessa forma, não são capazes de modificar os teores de FDN, a não ser de forma indireta, evitando perdas de CHO solúveis pela inibição de microrganismos que causam a perda de FDN. Redução dos teores de FDN pode ser explicada pela degradação da hemicelulose por meio da ação de enzimas da própria planta ou da hidrólise ácida (JONES; HATFIELD; MUCK, 1992). No entanto, a baixa ou ausência da atividade de enzimas, como as aminolíticas e hemicelulolíticas, permite que os teores de FDN não sejam reduzidos. Corroborando com essa evidência, Rodrigues et al. (2004) verificaram que silagens de milho (híbrido 510) inoculadas e adicionadas das enzimas amilase, hemicelulase e celulase, promoveram maior redução de FDN comparadas à silagem inoculada, porém sem adição das enzimas.

#### **4.4 Metabólitos e características microbiológicas**

Dentre os metabólitos detectados nas silagens de milho, o ácido lático foi o único a não ser influenciado significativamente ( $p > 0,05$ ) pelos fatores estudados, bem como pelas interações entre eles (Tabela 4). Uma explicação pode ser a semelhança entre os microrganismos em produzir ácido lático, uma vez que todas as cepas de BAL empregadas como inoculantes neste experimento eram heterofermentativas e sabe-se que BAL homofermentativas são as principais responsáveis por elevarem a produção de ácido lático durante a ensilagem (MUCK, 1996). É importante destacar que a silagem com a cepa

UFLA SIL 1 (*L. buchneri*), foi a silagem com menor teor de ácido láctico (mesmo sem apresentar nenhuma diferença significativa), proporcionou silagens com 40% a menos de ácido láctico do que as silagens inoculadas com as cepas UFLA SIL 2 (*L. plantarum*) e UFLA SIL 3 (*L. plantarum*), cujos teores for situam-se em torno de 56 g kg<sup>-1</sup> de MS (Tabela 5). Foi verificado que o tempo de fermentação proporcionou aumento da concentração do ácido láctico, embora nenhuma diferença significativa tenha sido registrada. As médias foram iguais a 48,0 e 49,1g Kg<sup>-1</sup>MS, aos 30 e 90 dias de fermentação, respectivamente.

A semelhança entre os teores de ácido láctico nas silagens com 30 e 90 dias de fermentação pode ser explicada pela estabilização da produção desse ácido até os 30 dias de fermentação. Isso é comum, principalmente quando as concentrações de carboidratos solúveis não são muito altas. Outra explicação pode ser a utilização desse ácido por outros microrganismos nos estádios finais de fermentação, o que faz com que um aumento nos teores desse ácido não seja notado com o tempo. Essas médias podem ser consideradas adequadas, uma vez que teores de ácido láctico variando de 4 a 7% na MS são citados como ideais para silagens bem fermentadas (KUNG JUNIOR; SHAVER, 2001).

Tabela 4 Probabilidade dos efeitos (p) e valores médios metabólitos e população de bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras das silagens de milho

Variável (g kg <sup>-1</sup> MS)	Médias	p valor					
		Inoculantes	Dose	Tempo	TRAT X D	TRATA X T	D X T
Ácido láctico	48,55	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ácido acético	3,04	0,001	NS	<0,001	NS	NS	NS
1,2-propanodiol	5,32	<0,001	NS	<0,001	NS	0,01	NS
Etanol	13,7	NS	NS	<0,001	NS	NS	NS
BAL (log UFC g <sup>-1</sup> )	8,03	<0,001	NS	<0,001	NS	<0,001	NS
Leveduras (log UFC g <sup>-1</sup> )	1,24	NS	NS	<0,004	NS	NS	NS

MS: matéria seca; NS: não significativo; TRAT X D: interação entre tratamento e dose; TRAT X T: interação entre tratamento e tempo; D X T: interação entre dose e tempo.

Tabela 5 Metabólitos e população de bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras nas silagens de milho

Variável (g kg <sup>-1</sup> MS)	Tempo	Média dos Inoculantes	Inoculantes (média)								
			1	2	3	4	5	6	7	8	Lalsil
Ácido-lático	30	48,0	33,6	56,2	56,0	45,5	46,1	53,9	52,9	45,0	47,6
	90	49,1									
Ácido acético	30	2,3B	3,8a	3,1a	1,9b	2,3b	3,3a	3,3a	4,2a	3,3a	2,2b
	90	3,7A									
1,2-propanodiol	30	4,4B	5,1aB	4,2a	3,7a	3,3a	5,1a	5,9a	6,1a	3,1aA	3,3a
	90	6,2A	12,4a A	4,9b	3,6b	4,1b	6,1b	6,7b	7,3b	5,9bB	4,7b
Etanol	30	10,3B	12,5	13,7	12,6	14,7	13,3	12,8	13,1	15,6	15,2
	90	17,1A									
BAL (log UFC g <sup>-1</sup> )	30	8,6A	8,3bA	9,0aA	8,4bA	8,3bA	8,9aA	8,5bA	8,9aA	8,6bA	8,9aA
	90	7,4B	7,8aB	7,9aA	7,6aB	7,3aB	7,1bB	7,1bB	7,7aB	7,5aB	6,5cB
Leveduras (log UFC g <sup>-1</sup> )	30	0,85B	1,4	1,2	1,3	1,5	0,9	0,9	1,2	1,6	1,1
	90	1,63A									

Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si (P>0,05) pelo teste de Scott Knott. Inoculantes UFLA SIL 1, 7 e 8 correspondem a cepas de *L. buchneri*; Inoculantes UFLA SIL 2, 3 e 4, cepas de *L. plantarum*; Inoculantes UFLA SIL 5 e 6, cepas de *L. hilgardii*

Diferentemente do ocorrido para o ácido láctico, verificou-se que os inoculantes e os tempos de fermentação exerceram efeito significativo ( $P < 0,001$ ) sobre os teores de ácido acético (Tabela 4). Não houve interação entre os fatores estudados. Assim, em média, as silagens inoculadas com as cepas UFLA SIL 1, 2, 5, 6, 7 e 8 apresentaram valores semelhantes e superiores ( $p = 0,001$ ) às silagens inoculadas com as outras cepas (Tabela 5). A diferença estatística registrada entre os tratamentos quanto à produção de ácido acético pode estar relacionada ao perfil das cepas inoculadas (heterofermentativas facultativas ou obrigatórias), uma vez que as heterofermentativas obrigatórias sintetizam maiores concentrações de ácido acético (MARI et al., 2009).

Dentre os inoculantes que produziram maiores teores de ácido acético destacaram-se as cepas heterofermentativas obrigatórias UFLA SIL 7 (*L. buchneri*), seguidas das cepas UFLA SIL 1 (*L. buchneri*) e as cepas UFLA SIL 5 e 6 (*L. hilgardii*). Essa evidência foi também registrada por Ranjit e Kung Junior (2000) que observaram o aumento da concentração de ácido acético quando silagens de milho foram inoculadas com *L. buchneri*.

A espécie de *L. buchneri*, caracteriza-se por apresentar rota metabólica heterolática, com capacidade de produzir ácido acético. O aumento na concentração de ácido acético como produto final da fermentação são justificados pelo fato das espécies heterofermentativas, em especial a *L. buchneri* (heterofermentativa obrigatória), não possuírem a enzima acetaldído desidrogenase, responsável pela redução de acetaldéido a etanol (AXELSSON, 2004; MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Observou-se que aos 90 dias de fermentação houve aumento da concentração de ácido acético correspondente a 37,8% em relação ao valor registrado aos 30 dias. Esse aumento pode ser decorrente do metabolismo de microrganismos que sobrevivem nos tempos finais de fermentação. Segundo

Oude-Elferink et al. (2001), *L. buchneri* tem a capacidade de degradar ácido láctico em ácido acético, assim como *L. hilgardii* também possuem essa capacidade (HEINL et al., 2012; SCHMIDT, 2009).

Os ácidos propiônico e butírico não foram detectados no presente estudo. Resultados contrários foram relatados por Ward (2000) que registraram concentrações de ácido propiônico e butírico variando entre 0,30 a 0,20 (% na MS) e 0,02 a 0,04 (% na MS), respectivamente, em silagens de milho. A ausência de ácido propiônico pode estar relacionada também à ausência de bactérias do ácido propiônico na silagem ou de BAL capazes de metabolizar 1,2-propanodiol, uma vez que a presença desse álcool foi registrada em todos os tratamentos deste trabalho. Krooneman et al. (2002) demonstraram que uma nova espécie denominada *L. diolivorans* foi capaz de degradar o 1,2-propanodiol presente na silagem em ácido 1-propanol e propiônico. O ácido propiônico em combinação com o ácido acético apresenta efeito de sinergismo capaz de inibir leveduras e fungos filamentosos, consequentemente, aumentando a estabilidade aeróbia. A não detecção de ácido butírico pode ser tratada como resultado positivo quanto à qualidade da silagem, uma vez que a presença desse ácido é indicativo da fermentação clostrídica, a qual causa perdas significativas de MS e redução da estabilidade e palatabilidade da silagem (ROTZ; MUCK, 1994). Corroborando com essa afirmação, Ferreira (2001) ressalta que a concentração de ácido butírico deve ser inferior a 0,1% na MS em silagem de milho.

Os álcoois presentes na silagem e detectados neste estudo foram o etanol e 1,2-propanodiol (Tabela 4). Verificou-se quanto à concentração de etanol efeito significativo ( $p < 0,001$ ) do tempo de fermentação, sendo possível notar o aumento da média dos teores desse álcool ao longo do processo fermentativo, sendo de 10,3 e 17,1 g kg<sup>-1</sup> de MS, aos 30 e 90 dias, respectivamente. A maior produção de etanol está associada normalmente à fermentação de açúcares e ácidos orgânicos por leveduras, porém deve-se

salientar que, traços de etanol podem estar presentes em decorrência da fermentação promovida pelas BAL heterofermentativas obrigatórias, como *L. buchneri* (FREITAS et al., 2006). Embora não tenha sido registrada diferença estatística entre os as cepas de BAL inoculadas, foi possível observar que os tratamentos 1e 3 (12,5 e 12,6 g kg<sup>-1</sup> de MS, respectivamente) apresentaram os menores teores de etanol. Esses resultados superaram os valores encontrados por Li e Nishino (2001) e se enquadram no intervalo de valores considerado aceitável para etanol (10 a 30 g Kg<sup>-1</sup>MS) em silagens de milho (KUNG JUNIOR; SHAVER, 2001).

Foi observada interação significativa entre os fatores inoculante e tempo de fermentação para a concentração de 1,2-propanodiol ( $p < 0,01$ ) (Tabela 4). Houve diferença entre os teores de 1,2-propanodiol das silagens com os diferentes inoculantes e essa diferença foi dependente do tempo de fermentação (Tabela 5). Quando se avaliou as silagens inoculadas com as diferentes cepas aos 30 dias de fermentação não foi observada diferença entre as silagens, sendo que em média, a concentração média de 1,2- propanodiol foi igual a 4,4 g kg<sup>-1</sup> de MS. Aos 90 dias de fermentação, entretanto, houve diferença entre as silagens. A silagem inoculada com a cepa UFLA SIL 1 (*L. buchneri*) apresentou teor muito superior de 1,2 propanodiol (12,4 g kg<sup>-1</sup> de MS) do que as outras silagens, cujos teores foram semelhantes e com média de 5,4 g kg<sup>-1</sup> de MS. Segundo Oude-Elferink et al. (2001), microrganismos dessa espécie podem degradar ácido láctico a acético e 1,2 propanodiol. Outras cepas também identificadas com *L. buchneri* (UFLA SIL 7, UFLA SIL 8 e Lalsil) não apresentaram esse efeito, demonstrando que cepas da mesma espécie apresentam características diferentes.

A presença de 1,2 propanodiol na silagem pode justificar a ausência de ácido propiônico verificada no presente trabalho, conforme relatado anteriormente, uma vez que o 1,2 - propanodiol atua como substrato para

algumas espécies de *Lactobacillus* produzirem ácido propiônico (KROONEMAN et al., 2002). Nishino et al. (2003), avaliando os efeitos da inoculação de *Lactobacillus buchneri* sobre as características fermentativas e a estabilidade aeróbia da silagem de milho, constataram o acúmulo de 1,2 propanodiol sem aumento na concentração de ácido propiônico. De acordo com Danner et al. (2002), o 1,2-propanodiol, de fato, possui como principal função atuar como substrato para a produção de ácido propiônico e a presença desse álcool não exerce efeito sobre a estabilidade aeróbia das silagens.

A população inicial de BAL presente na forrageira, antes da ensilagem, foi em média, foi igual a 5,79 log UFC g<sup>-1</sup> (Tabela 2). Esse número de bactérias confere com a determinação mínima de BAL (5,0 log UFC g<sup>-1</sup>) em planta fresca de milho, proposto por Muck (1991), para que as perdas significativas deixem de ocorrer ao longo da fermentação em decorrência da prevalência da fermentação láctica das silagens. Após inoculação e fermentação da silagem, observou interação significativa (p<0,001) entre os fatores inoculante e tempo de fermentação para a população de BAL (Tabela 4). Aos 30 dias, as silagens com as cepas UFLA SIL 2 (*L. plantarum*), UFLA SIL 5 (*L. hilgardii*), UFLA SIL 7 (*L. buchneri*) e Lalsil apresentaram as maiores populações médias de BAL e ao passo que 90 dias foram as silagens com as cepas UFLA SIL 1 (*L. buchneri*), UFLA SIL 2 (*L. plantarum*), UFLA SIL 3 (*L. plantarum*), UFLA SIL 7 e 8 (*L. buchneri*).

Com exceção da silagem com a cepa UFLA SIL 2 (*L. plantarum*), para todas as outras houve redução na população de BAL com o decorrer da fermentação de 30 para 90 dias. A redução do número de BAL, ao longo do processo fermentativo, foi relatada também por Li e Nishino (2011) e Santos (2012). O decréscimo da população de BAL pode ser atribuído à sucessão de gêneros desse grupo que ocorre ao longo do processo fermentativo (HAMMES et al., 1992). No estágio inicial da fermentação, há a predominância de bactérias

pertencentes aos gêneros mais resistentes às condições ácidas, como *Streptococcus*, seguidas de *Leuconostoc* e por fim, *Lactobacillus* e *Pediococcus*. No decorrer do processo, as BAL pertencentes ao gênero *Lactobacillus* perdem a viabilidade e alguns microrganismos especializados, tais como *L. buchneri*, continuam ativos, porém em baixa densidade (OUDE-ELFERINK et al., 2000).

Algumas cepas podem se manter viáveis por mais tempo no processo fermentativo e está é uma importante característica no processo de seleção de cepas. Os inoculantes que proporcionaram silagens com maior população de BAL aos 30 e 90 dias, foram as cepas UFLA SIL 2 (*L. plantarum*) e UFLA SIL 7 (*L. buchneri*). Além disso, a contagem de BAL na silagem com a cepa UFLA SIL 2 não diminuiu com a fermentação. Vale ainda ressaltar, que as médias do número de BAL (8,6 e 7,4 log UFC g<sup>-1</sup>, aos 30 e 90 dias de fermentação, respectivamente) registradas no presente trabalho estão próximas ao valor proposto por McDonald, Henderson e Heron (1991) como número necessário de BAL (8,0 log UFC g<sup>-1</sup>) para que ocorra acentuada queda de pH.

Considerando a população de leveduras presente na forragem fresca (2,74 log UFC g<sup>-1</sup>), pôde-se constatar que após a fermentação houve diminuição do número desses microrganismos para todos os tratamentos (Tabela 4). Foi registrado o efeito significativo ( $p < 0,05$ ) do tempo de fermentação, uma vez que aos 30 dias a média do número de leveduras foi igual a 0,85 log UFC g<sup>-1</sup> e aos 90 dias de fermentação, igual a 1,63 log UFC g<sup>-1</sup>, o que representa, portanto, um aumento de 47,8% ao longo do processo fermentativo (Tabela 5). Após 30 dias de fermentação, foi verificada uma população média de leveduras menor que 2 log UFC g<sup>-1</sup> para todos os tratamentos. Resultado semelhante foi obtido por Muck (2004), o qual relatou número médio de leveduras igual a 1,55 log UFC g<sup>-1</sup> nas silagens de milho adicionadas de diferentes inoculantes. A redução do número de leveduras no primeiro estágio do processo fermentativo pode ser explicada pela inoculação das cepas de BAL terem permitido a elevação da

concentração de ácido acético (OUDE-ELFERINK et al., 2001), que, segundo Moon (1983), é um composto capaz de inibir o crescimento de leveduras. Embora aos 90 dias o teor de ácido acético tenha sido superior ao registrado aos 30 dias de fermentação, o aumento da população de leveduras pode estar relacionado à entrada de oxigênio nos silos permitindo a multiplicação das leveduras, ainda que lentamente, durante todo o período de fermentação (BORREANI; TABACCO; COLOMBARI, 2002). Vale ainda ressaltar, que o número de leveduras em silagens pode variar de  $<10^2$  a  $10^{12}$  UFC g<sup>-1</sup> de MS (WOOLFORD, 1990).

Ainda que tenha ocorrido um aumento do número de leveduras com o decorrer do processo fermentativo, o acréscimo da população pode ser considerado discreto e não prejudicial à qualidade da silagem, uma vez que é aceitável o número de leveduras de até 5,0 log UFC g<sup>-1</sup> (BORREANI; TABACCO; COLOMBARI, 2002; KUNG JUNIOR et al., 1998; MUCK, 2004). As populações de leveduras acima de 5,0 log UFC/g<sup>-1</sup> podem causar elevação da temperatura e início da deterioração das silagens seguida da ação de outros microrganismos deterioradores que metabolizam os componentes solúveis presentes na massa elevando a produção de calor (RANJIT; KUNG JUNIOR, 2000). O aumento na população média de leveduras pode explicar, em parte, o aumento na concentração de etanol aos 90 dias de fermentação.

As doses de adição dos inoculantes não afetaram significativamente a produção de nenhum dos metabólitos detectados e nem a população de BAL. Como já mencionado, as populações de BAL, mesmo em silagens sem adição de inoculantes, podem chegar a valores tão altos quanto às de silagens não inoculadas, podendo explicar o fato de não ter sido verificada diferença na população final, aos 30 dias. As bactérias lácticas epifíticas são as abundantes e atuantes no processo fermentativo da silagem (SANTOS et al., 2008). A presença e a quantidade desse grupo de bactérias determinam se a fermentação é

adequada e se há a necessidade de se aplicar inoculantes microbianos (CHUNJIAN; BOLSEN; FUNG, 1992). Pahlow (1986), revisando a literatura, verificaram que a maioria das plantas forrageiras no momento da ensilagem apresenta uma população epifítica de bactérias do ácido lático em torno de  $10^4$  a  $10^5$  UFC  $g^{-1}$  forrageira. No entanto, a população de BAL epifítica é muito inferior àquela de bactérias aeróbias, o que muitas vezes acarreta falhas no processo fermentativo. Portanto, mesmo que a forrageira apresente uma população de BAL em número ideal é recomendada ainda a inoculação deste grupo de bactérias na silagem (PEREIRA; ROCHA; FERREIRA, 2007). Uma explicação para a dose de inoculante não ter proporcionado efeito sobre o número de BAL pode ser o tempo em que foi feita a primeira avaliação. Populações mais altas dos inoculantes podem proporcionar diferenças no início do processo, mas com 30 dias de fermentação pode ser que essa população já tenha se igualado. Neste trabalho, no entanto, as doses não afetaram nem as características fermentativas demonstrando dessa forma, que não houve diferenças em se aplicar 5 ou 6 log UFC  $g^{-1}$  de forragem. Resultados semelhantes foram obtidos por Basso et al. (2012) ao verificarem que diferentes doses de *L. buchneri* ( $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$ ) não exerceram influência sobre algumas características fermentativas, como o teor de ácido lático. Para explicar tais resultados, os autores ressaltaram a existência de duas vias de fermentação para as BAL heterofermentativas. Na primeira via, de acordo com McDonald, Henderson e Heron (1991), as BAL heterofermentativas facultativas convertem a glicose e a frutose em ácido lático, ácido acético, manitol,  $CO_2$  e água. Na segunda via, as BAL heterofermentativas obrigatórias são capazes de converter o ácido lático, anaerobicamente, a ácido acético, 1, 2 propanodiol e quantidades pequenas de etanol (OUDE-ELFERINK et al., 2001).

A população de fungos filamentosos foi a característica mais afetada pelos fatores estudados. Observou-se o efeito significativo ( $p < 0,001$ ) dos

tratamentos, das doses de inoculação, dos tempos de fermentação e interações entre esses fatores (Tabela 6). Foram desdobradas as interações de maior interesse nos estudos, ou seja, as diferenças entre as silagens com relação às doses dos inoculantes e aos tempos de fermentação (Tabela 6).

Ao avaliar as diferentes silagens nas duas doses, verificou-se que quando foi adicionado 5 log UFC g<sup>-1</sup> de forragem, as silagens com os inoculantes UFLA SIL 8 (*L. buchneri*) e Lalsil apresentaram contagens abaixo do mínimo detectável (2 log) e para as outras silagens, os valores foram superiores e semelhantes entre si. Aos 90 dias, com exceção da cepa UFLA SIL 1 (*L. buchneri*), todos os tratamentos inoculados proporcionaram silagens com contagens abaixo de 2 log UFC g<sup>-1</sup> de silagem. Assim, os inoculantes UFLA SIL 8 e Lalsil foram os mais eficientes na inibição de fungos filamentosos em doses mais baixas. Para todos os outros tratamentos, verificou-se a necessidade da maior dosagem (6 log UFC g<sup>-1</sup>) para reduzir a população desses fungos. A exceção foi a cepa UFLA SIL 1, a qual não apresentou diferença na redução da população de fungos filamentosos para nenhuma das doses aplicadas.

Tabela 6 População de fungos filamentosos e valores de pH das silagens de milho adicionadas de diferentes inoculantes em dois tempos de fermentação

Fungos Filamentosos (log UFC/g de silagem)											
Probabilidade dos efeitos ( <i>p</i> )											
Inoculantes (Inoc)		Dose (D)		Tempo (T)		I1		I2		I3	
<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
Inoculantes											
		1	2	3	4	5	6	7	8	Lal	Média
Dose	5 log	7,8aA	4,8a	4,4a	4,2a	4,6a	4,8a	4,1a	<2b	<2b	3,7
	6 log	2,8aB	<2b	<2b	<2b	<2b	<2b	<2b	<2b	<2b	<2
Tempo	30	4,7aA	3,6bA	3,5bA	3,5b	4,8a	3,6bA	3,4b	<2c	<2c	3,4
	90	2,9aB	2,6aB	1,4aB	<2b	<2b	2,2aB	<2b	2,1a	2,4a	1,9
	Média*	3,8	3,1	2,9	2,1	3,2	2,9	2,7	<2log	<2log	
Valores de pH											
Probabilidade dos efeitos ( <i>p</i> )											
Inoculantes (Inoc)		Dose (D)		Tempo (T)		TRAT x D		TRAT x T		D x T	
<0,042		<0,041		<0,001		NS		NS		NS	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Média
Tratamentos		3,99a	3,88b	3,88b	3,88b	3,88b	3,90b	3,95a	3,91b	3,90b	3,9
Dose						Tempo					
5 log			6log			30			60		
3,89b			3,93a			3,86b			3,95a		

\*Média entre os tempos. NS: não significativo; I1: interação entre tratamento e dose; I2: interação entre tratamento e tempo; I3: interação entre dose e tempo. Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si ( $P>0,05$ ) pelo teste de Scott Knott. Inoculantes UFLA SIL 1, 7 e 8 correspondem a cepas de *L. buchneri*; Inoculantes UFLA SIL 2, 3 e 4, cepas de *L. plantarum*; Inoculantes UFLA SIL 5 e 6, cepas de *L. hilgardii*



A influência da dosagem do inoculante na silagem de milho sobre os fungos filamentosos foi também relatada por Schmidt e Kung Junior (2010) que verificaram menor população desses microrganismos quando cepas de BAL foram inoculadas em dose igual  $4 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  frente a uma dosagem de  $1 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$ . Esses resultados corroboram aos encontrados por Reis et al. (2008) que verificaram menor número de fungos filamentosos quando aplicada uma dosagem de inoculante igual a  $1 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  em relação à dosagem de  $5 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  de *L. buchneri*, em silagens de grãos de milho.

A população de fungos filamentosos presente na forragem fresca foi igual a 2,09 log UFC  $g^{-1}$  (Tabela 2). Após a inoculação com os diferentes tratamentos, esse valor sofreu variações que dependeram do tipo de inoculante utilizado. Com exceção das silagens com as cepas UFLA SIL 8 (*L. buchneri*) e Lalsil anãs quais as populações de fungos filamentosos estiveram abaixo de 2 log UFC  $g^{-1}$ , todas as outras silagens apresentaram aumento, aos 30 dias de fermentação, cujos valores variaram de 3,4 log UFC  $g^{-1}$  a 4,8 log UFC  $g^{-1}$ . Porém, após 90 dias do processo fermentativo, foi notada a diminuição da população de fungos filamentosos para todas as silagens, com exceção daquelas inoculadas com as cepas UFLA SIL 8 e Lalsil. A cepa UFLA SIL 5 e 7 (*L. hilgardii*, *L. buchneri*) foram as que proporcionaram menores populações de fungos filamentosos, ao final do processo de fermentação (90 dias), além de ser as que resultaram em silagens com maior teor de ácido acético (Tabela 4). Esse, talvez, seja um indicativo de que a cepa seja mais eficiente no início do processo fermentativo.

A redução da população de fungos filamentosos se apresenta como resultado positivo para a qualidade da silagem, uma vez que a presença desses fungos tem efeito negativo no seu valor nutritivo, em função da degradação dos substratos e pela produção de toxinas que afetam o metabolismo animal. A diminuição do número de fungos filamentosos no presente trabalho pode estar

relacionada às concentrações de ácido acético verificadas ao longo do processo fermentativo. Aos 90 dias de fermentação, houve um aumento da concentração desse ácido (Tabela 4) o que, possivelmente, refletiu de forma direta na população de fungos filamentosos, promovendo, portanto, a redução do número desses microrganismos ao final da fermentação (90 dias). Ranjit e Kung Junior (2000) também ressaltaram o efeito das inoculações de BAL em silagens de milho, proporcionando menores contagens de fungos filamentosos quando comparadas às silagens não tratadas. O número médio de fungos filamentosos registrada, aos 90 dias de fermentação, no presente trabalho, foi semelhante à relatada por Muck (2004) que verificou uma população de fungos filamentosos igual a  $1,18 \log \text{ UFC g}^{-1}$ , em silagem tratada com diferentes inoculantes, incluindo *L. buchneri*.

Para os valores de pH, verificou-se influência significativa dos tratamentos ( $p < 0,05$ ), da dose de inoculação ( $p < 0,05$ ) e do tempo de fermentação ( $p < 0,001$ ), conforme expostos na Tabela 6. Todos os tratamentos proporcionaram a diminuição do pH em relação ao valor verificado na forragem fresca (4,78). No entanto, os tratamentos com as cepas UFLA SIL 1e 7 (*L. buchneri*), se diferenciaram dos demais por apresentarem as menores reduções de pH, cujas médias foram iguais a 3,99 e 3,95, respectivamente. A maior dose de inoculação ( $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ) comparada à menor dosagem ( $5 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ) não foi benéfica, pois proporcionou o aumento do pH. O tempo de fermentação também proporcionou aumento do pH, sendo que aos 90 dias foi observada média igual a 3,95 e aos 30 dias de fermentação, a média de pH foi 3,86.

O aumento da média dos valores de pH, aos 90 dias de fermentação, pode ser justificado pela possível ação de microrganismos aeróbios, como as leveduras que, em média, aumentaram com a fermentação (Tabela 4) e que podem degradar os ácidos orgânicos. Ávila et al. (2010) isolaram 81 cepas de BAL de silagem de cana-de-açúcar das quais 65% eram capazes de metabolizar

ácido láctico e produzir etanol e CO<sub>2</sub>. Vale ainda ressaltar que as bactérias lácticas heterofermentativas obrigatórias, como as cepas *L. buchneri* e *L. hilgardii* empregadas no presente trabalho são capazes de degradar o ácido láctico a acético elevando, dessa forma, o pH (OUDE-ELFERINK et al., 2001). Não foram verificadas efeitos das interações entre tratamento, dose de inoculação e tempo de fermentação (Tabela 6).

Os valores médios de pH obtidos no presente trabalho se enquadram no intervalo de pH (3,7 a 4,2) considerado adequado ao processo fermentativo da silagem de milho, segundo Kung Junior e Shaver (2001). Baixos valores de pH das silagens inibem o crescimento de microrganismos que podem causar problemas aos animais e ao homem, como enterobactérias e bactérias dos gêneros *Listeria* e *Clostridium*, melhorando a qualidade fermentativa e sanitária durante os processos aeróbio e anaeróbio (BOLSEN, 1995). De qualquer forma, é importante ressaltar que somente o baixo pH não é suficiente para inibir os microrganismos indesejáveis, em especial enterobactérias e clostrídeos, sendo ainda necessária que a redução do pH seja rápida e acompanhada da produção de ácidos como acético e propiônico.

A maior dosagem de inoculante utilizada neste trabalho pode ter causado aumento do pH pela inclusão de bactérias heterofermentativas na ensilagem, uma vez que essas bactérias têm propiciado, em silagens de milho e alfafa, valores de pH mais elevados do que aquelas que sequer foram inoculadas, conforme observado por Driehuis et al. (1999) e Kung Junior et al. (2003). Corroborando com esses resultados, Driehuis et al. (1999), Filya, Sucu e Karabulut (2006) e Ranjit, Taylor e Kung Junior (2002) observaram valores mais altos de pH em silagem de milho com o aumento das doses de *L. buchneri*. Reis et al. (2008) verificaram que a inoculação de  $2 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup> de *L. buckneri*, em silagens de grãos de milho, proporcionou um valor de pH igual a 4,2, enquanto a dosagem de inoculação equivalente a  $1 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup> da mesma

bactéria permitiu à silagem um valor de pH igual 4,0. Entretanto, Basso et al. (2012) não verificaram aumento dos valores de pH em função das doses crescentes de inoculantes.

#### **4.5 Avaliação da estabilidade aeróbia**

A estabilidade aeróbia da silagem pode ser avaliada indiretamente por meio da temperatura. Alguns autores sugerem que o tempo transcorrido para que a silagem atinja temperatura superior a 2°C acima da temperatura ambiente (TAYLOR; KUNG JUNIOR, 2002) seja o tempo em que as silagens permaneçam estáveis. Verificou-se que o fator tempo de fermentação promoveu efeito significativo ( $p < 0,001$ ) sobre todas as variáveis relacionadas à estabilidade da silagem (Tabela 7). Assim, é importante esclarecer que, no presente estudo, as aclimações nos ambientes onde foram alocadas as amostras de cada silo experimental, foram diferentes para os tempos de fermentação avaliados (30 e 90 dias). No primeiro caso (30 dias), a temperatura ambiente média do local, aonde se encontrava as amostras, foi igual a 23.48°C. Para a avaliação aos 90 dias de fermentação, as amostras permaneceram em local cuja temperatura ambiente foi igual a 20.12°C. Logo, não seria conveniente fazer as comparações das variáveis “temperatura máxima”, “tempo para atingir a temperatura máxima” entre os diferentes tempos de fermentação. A partir dos valores de temperatura obtidos com os *data loggers*, foram calculadas a temperatura máxima ( $T_m$ ) e o tempo necessário para alcançar essas temperaturas (TTMAX), para cada amostra de silagem inoculada.

Os diferentes inoculantes, bem como as duas doses estudadas, não modificaram significativamente a estabilidade aeróbia das silagens (Tabela 7). Houve efeito apenas do tempo ( $p < 0,001$ ) sobre essa variável. A estabilidade aeróbia das silagens foi maior aos 90 dias de fermentação (Tabela 7), o que pode

ter ocorrido em função do maior teor de ácido acético (Tabela 4), menor contagem de fungos filamentosos (Tabela 6) ou menor disponibilidade de nutrientes em geral, ou mesmo pela menor temperatura do ambiente, mostrando que silagens em ambientes mais quentes tendem a ter estabilidade menor (ASHBELL et al., 2002; BERNARDES et al., 2007; DRIEHUIS et al., 2001).

Tabela 7 Probabilidade dos efeitos (p) para os dados referentes à estabilidade aeróbia das silagens

Variável	Tratamentos	Dose	Tempo	I1	I2	I3	I4
Tmax (°C)	NS	NS	<0,001	NS	NS	NS	NS
Tempo (dias)	30		90				
	39,2a		32,3b				
EA	NS	NS	<0,001	NS	NS	NS	NS
Tempo (dias)	30		90				
	25,41b		58,21a				
TTmax (horas)	<0,01	NS	<0,001	NS	<0,01	NS	NS
Tempo (dias)	30		90				
	42,34b		109,87a				

Tmax: temperatura máxima; EA: estabilidade aeróbia; TTMAX: tempo para atingir a temperatura máxima; NS: não significativo; I1: interação entre tratamento e dose; I2: interação entre tratamento e tempo; I3: interação entre dose e tempo; I4: interação ente tratamento, dose e tempo. Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si ( $P>0,05$ ) pelo teste de *Scott-Knott*

Esse valor de estabilidade foi superior ao encontrado por Gimenes et al. (2006) para silagem de milho tratada com inoculante bacteriano (33 horas) após 74 dias de fermentação e inferior aos encontrados por Schmidt e Kung Junior (2010) (123 horas) e Danner, Mayrhuber e Braun (2003) (80,29 horas). Segundo Driehuis et al. (2001), a aplicação de *Lactobacillus buchneri* isoladamente ou

associada a bactérias lácticas eleva a estabilidade aeróbia da silagem de milho, reduzindo a população de leveduras e de fungos filamentosos. Essa evidência foi também relatada por Ranjit e Kung Junior (2000) que avaliaram a estabilidade aeróbia de silagem de milho inoculada com cepas de BAL heterofermentativas facultativa (*L. plantarum*) e heterofermentativas obrigatórias (*L. buchneri*), separadamente ou combinadas, e verificaram que a inoculação de cepas de *L. buchneri* determinou a melhor estabilidade aeróbia. Ranjit e Kung Junior (2000) relacionam a maior estabilidade aeróbia da silagem proporcionada por espécies de BAL heterofermentativas a maior produção de ácido acético que, por sua vez, inibe os microrganismos deterioradores responsáveis pela diminuição da estabilidade aeróbia da silagem. No entanto, é preciso cautela ao interpretar os resultados de estabilidade aeróbia, considerando os aditivos utilizados porque vários fatores afetam a estabilidade da silagem, entre eles o pH, os teores de etanol, ácidos acético, o lático, carboidratos solúveis residuais e as populações iniciais de leveduras e de fungos filamentosos, fazendo com que a temperatura de forma isolada não seja o parâmetro mais indicado para caracterização da estabilidade aeróbia (MUCK, 1991; SIQUEIRA et al., 2010).

Para o TTMAX, observaram-se, ainda, os efeitos significativos ( $p < 0,01$ ) dos tratamentos e da interação desses com o tempo de fermentação (TRATxT). Aos 30 dias de fermentação, verificou-se a maior temperatura máxima alcançada pela silagem (39,2°C), ocorrendo a diminuição da temperatura máxima aos 90 dias (32,3°C). Essa diminuição da Tm aos 90 dias pode ser explicada em função do aumento da concentração de ácido acético e redução de fungos filamentosos aos 90 dias. Os maiores acúmulos de temperatura significam maior aquecimento da massa ensilada após a abertura decorrente da maior intensidade de reações promovidas pelos microrganismos ao ambiente aeróbio, os quais se utilizam dos nutrientes disponíveis na silagem, provocando perdas no valor nutritivo

(BALSALOBRE; NUSSIO; MARTHA JÚNIOR, 2001; MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

O tempo de fermentação exerceu efeito significativo sobre o TTMAX cujo valor médio, foi maior aos 90 dias (109,87 horas). Aos 30 dias de fermentação, os valores de TTMAX foram semelhantes entre as silagens com diferentes inoculantes (Gráfico 1). Entretanto, aos 90 dias de fermentação, entretanto, os maiores valores de TTMAX foram verificados para os tratamentos UFLA SIL 1 (*L. buchneri*), 2 (*L. plantarum*) e 5 (*L. hilgardii*), ou seja, para alcançar a Tm desses foram necessários mais tempo, sendo esses inoculantes eficientes em estender a TTMAX. Basso et al. (2012) e Johnson et al. (2002) também verificaram elevação no tempo para atingir a temperatura máxima (TTMAX) para as silagens inoculadas após a exposição aeróbia. Os fungos filamentosos e leveduras são os principais responsáveis pela deterioração aeróbia das silagens com consequente aumento da temperatura, espera-se que as silagens inoculadas com BAL heterofermentativas facultativas, como a cepa *L. plantarum* empregada no presente estudo, sejam mais propícias à ação desses microrganismos deterioradores, uma vez que o ácido láctico produzido em elevada concentração por esse grupo de BAL é substrato para o crescimento de tais microrganismos indesejáveis, culminando na diminuição do TTMAX. Ao contrário, silagens inoculadas com cepas de BAL heterofermentativas obrigatórias, como a *L. buchneri* e *L. hilgardii*, são menos susceptíveis à deterioração, pois essas bactérias utilizam o ácido láctico e o disponibiliza para leveduras e fungos filamentosos e ainda produzem a partir desse substrato, o ácido acético, 1,2 propanodial e ácido propiônico que inibem leveduras e fungos filamentosos e, portanto, propiciam o aumento do TTMAX.

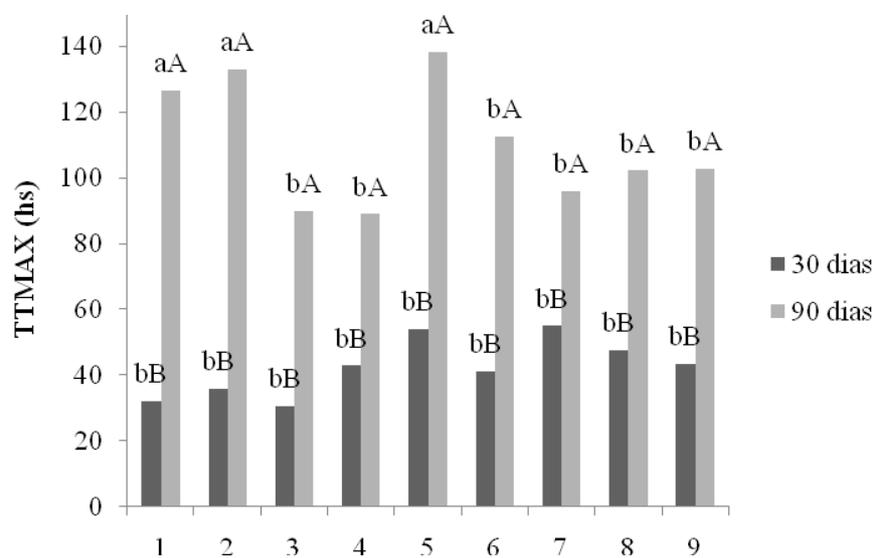


Gráfico 1 Tempo necessário para alcançar as temperaturas máximas (TTMAX) nas silagens de milho inoculadas com diferentes cepas em dois tempos de fermentação

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não se diferem ( $p < 0,05$ ) estatisticamente nas colunas referentes ao tempo de 30 dias, enquanto médias seguidas de letras minúsculas iguais não se diferem ( $p < 0,05$ ) estatisticamente nas colunas referentes ao tempo de 90 dias. Para ambos foi aplicado teste de *Scott-Knott*

## 5 CONCLUSÃO

A inoculação com as diferentes cepas de BAL alterou de forma similar as características bromatológicas sem apresentar, no entanto, diferenças no valor nutritivo das silagens de milho avaliadas após o período de fermentação. Entretanto é possível salientar que as silagens inoculadas com as cepas UFLA SIL 1, 2, 5, 6, 7 e 8 apresentaram elevadas produções de ácido acético e de 1,2 propanodiol.

Efeitos diferentes sobre as populações de BAL e de fungos filamentosos foram proporcionados pelos tratamentos inoculados nas silagens de milho, fato não observado para a população de leveduras. As cepas UFLA SIL 2 e 7 esteve sempre entre os melhores tratamentos que proporcionaram o maior número de BAL nas silagens, ao longo de todo o processo fermentativo. Essas cepas, no entanto, não foram os melhores tratamentos a fim de proporcionar a redução do número de fungos filamentosos, sendo as cepas UFLA SIL 8 e Lalsil as que se destacarem quanto essa avaliação.

O tempo de fermentação foi o fator essencial a ser considerado para se obter a qualidade de silagens de milho inoculadas com BAL, uma vez que, aos 90 dias do processo fermentativo, foi possível ocorrer o aumento dos teores de ácido acético e 1,2 propanodiol e maior estabilidade das silagens, quando comparados aos 30 dias de fermentação.

Determinou-se para os tratamentos testados que a dose de inoculação indicada é a de  $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$  de forragem por proporcionar a maior redução de fungos filamentosos na silagem de milho, reduzindo, dessa forma, a deterioração aeróbia por esses microrganismos.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, R. C.; BERNARDES, T. F. **Existe necessidade de inoculantes para silagem de milho**. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/conservacao-de-forragens/existe-necessidade-de-inoculantes-para-silagem-de-milho-60855n.aspx>>. Acesso em: 10 fev. 2013.
- ASHBELL, G. et al. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 28, n. 5, p. 261-263, May 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15<sup>th</sup> ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117 p.
- ÁVILA, C. L. S. et al. Aerobic stability of sugar cane silages with a novel strain of *Lactobacillus* sp. isolated from sugar cane. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 41, n. 2, p. 249-255, fev. 2012.
- \_\_\_\_\_. Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculants. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 1, p. 25-32, jan./fev. 2010.
- \_\_\_\_\_. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugarcane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 384-394, Aug. 2009.
- AXELSON, L. Classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von (Ed.). **Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: M. Dekker, 1993. p. 1-72.
- AXELSSON, L. Bactérias lácticas: classificação e fisiologia. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von; OUWEHAND, A. (Ed.). **Bactérias do ácido láctico: aspectos microbiologia e funcional**. New York: M. Dekker, 2004. p. 1-66.

BALSALOBRE, M. A. A.; NUSSIO, L. G.; MARTHA JÚNIOR, G. B. Controle de perdas na produção de silagens de gramíneas tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. p. 890-911.

BANEMANN, D. et al. Silages as feedstock for biogas: novel perspectives for silage additives. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION, 14., 2010, Brno. **Proceedings...** Brno: ISFC, 2010. p. 114-116.

BASSO, F. C. et al. Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 41, n. 7, p. 1789-1794, jul. 2012.

BERNARDES, T. F. et al. Avaliação da queima e da adição de milho desintegrado com palha e sabugo na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 2, p. 269-275, ago. 2007.

BERNADES, T. F.; REIS, R. A.; MOREIRA, A. L. Perfil fermentativo e microbiológico das silagens do capim marandu aditivadas com polpa cítrica peletizada. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 3, p. 214-220, 2005.

BOLSEN, K. K. Silage: basic principles. In: BARNES, R. F. et al. (Ed.). **Forages**. 5<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University, 1995. p. 163-176.

BOLSEN, K. K.; WILKINSON, M.; LIN, C. J. Biotechnology in feed industry: evolution of silage and inoculants: processes and prevention. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 16., 2000, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 2000. 1 CD-ROM.

BORREANI, G.; TABACCO, E.; COLOMBARI, G. Influenza del deteriorazione aeróbica degli insilati sulla qualità dei prodotti caseari. **L'informatore Agrario**, Verona, v. 11, p. 57-62, 2002.

BROBERG, A. et al. Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 2, p. 5547-5552, July 2007.

CARVALHO, B. F. et al. 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 and Forage Science**, Oxford, v. 67, n. 4, p. 589-595, Nov. 2012.

CHERNEY, J. H.; CHERNEY, D. J. R. Assessing silage quality. In: BUXTON, C. et al. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: Wisconsin, 2003. p. 141-198.

CHUNJIAN, L.; BOLSEN, B. E.; FUNG, D. Y. C. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling periods of alfalfa and maize. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 73, n. 5, p. 375-387, Mar. 1992.

CRUZ, J. C. et al. **Produção e composição bromatológicas de cultivares de milho para ensilagem**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2005. 199 p.

DANNER, H. et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 562-567, Feb. 2002.

DANNER, H.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 562-567, Apr. 2003.

DRIEHUIS, F. Occurrence of mycotoxins in silage. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro: USP, 2011. 1 CD-ROM.

\_\_\_\_\_. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012, Hämeenlinna. **Proceedings...** Hämeenlinna: ISC, 2012. p. 87-104.

DRIEHUIS, F. et al. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, n. 4, p. 583-594, 1999.

DRIEHUIS, F.; OUDE-ELFERINK, S. J. W. H.; WIKSELAAR, P. G. van. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 330-343, Dec. 2001.

DRIEHUIS, F.; WIKSELAAR, P. G. van. The occurrence and prevention of ethanol fermentation in high-dry-matter grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 6, p. 711-718, May 2000.

DUBOIS, M. et al. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemical**, London, v. 28, p. 350-356, 1956.

EICHELBERGER, L.; SIEWERDT, L.; SOUZA JÚNIOR, P. Efeitos da inclusão de níveis crescentes de forragem de soja e uso de inoculante na qualidade da silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 26, n. 2, p. 867-874, fev. 1997.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.

FERREIRA, J. J. Características qualitativas e produtivas da planta de milho e sorgo. In: CRUZ, J. C. et al. (Ed.). **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2001. p. 383-404.

FREITAS, A. W. P. et al. Avaliação da qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar com aditivos microbianos e enriquecida com resíduo da colheita de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 38-47, fev. 2006.

FYLIA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 11, p. 3575-3581, Nov. 2003.

FILYA, I.; SUCU, E. The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 446-455, Dec. 2010.

FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effect of *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, n. 6, p. 1216-1223, Dec. 2006.

GIFFEL, M. C. et al. Bacterial spores in silage and raw milk. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, n. 1/4, p. 625-630, 2002.

GIMENES, A. L. G. et al. Composição química e estabilidade aeróbia em silagens de milho preparadas com inoculantes bacteriano e/ou enzimático. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 153-158, 2006.

GOLLOP, N.; ZAKIN, V.; WEINBERG, Z. G. Atividade antibacteriana de bactérias de ácido láctico incluídos no inoculantes para silagem e em silagens tratadas com esses inoculantes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 3, p. 662-666, Mar. 2005.

GOURLEY, L. M.; LUSK, J. W. Genetic parameters related to sorghum silage quality. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 61, p. 1821-1827, 1978.

HAMMES, W. P. et al. The genus *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS, A. et al. (Ed.). **The prokaryotes**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 719-767.

HEINL, S. et al. Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 161, n. 2, p. 153-166, Oct. 2012.

HENDERSON, N. Additives silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 35-56, Dec. 1993.

HIGGINBOTHAM, G. E. et al. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 8, p. 2185-2192, Aug. 1998.

HILL, H. A. Microbial ecology of lactobacilli in silage. In: FOOD FOR THOUGHT, FORAGE SYMPOSIUM, 2., 1989, Johnston. **Proceedings...** Johnston: Pioneer Hi-Bred, 1989. p. 47-64.

HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p. 1791-1794, Aug. 1999.

JAAKKOLA, S.; HUHTANEN, P.; HISSA, K. The effect of cell wall degrading enzymes or formic acid on fermentation quality and on digestion of grass silage of cattle. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 75-87, Mar. 1991.

JATKAUSKAS, J.; VROTNIAKIENĖ, V. Performance of dairy cows fed with high moisture whole plant maize silage inoculated with *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum*. **Archiva Zootechnica**, Balotesti, v. 8, n. 1, p. 75-87, Mar. 2005.

JOBIM, C. C. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 1, p. 101-119, maio 2007.

\_\_\_\_\_. Presença de microrganismos na silagem de grãos úmidos de milho ensilado com diferentes proporções de sabugo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 201-204, fev. 1997.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D. Microbiologia de forragens conservadas. In: REIS, R. A. et al. (Ed.). **Volumosos na produção de ruminantes: valor alimentício de forragens**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. p. 1-2.

JOHNSON, L. M. et al. Corn silage management: effects of maturity, inoculation, and mechanical processing on pack density and aerobic stability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 2, p. 434-444, Feb. 2002.

JONES, B. A.; HATFIELD, R. D.; MUCK, R. E. Effects of fermentation and bacterial inoculation on lucerne cell walls. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 60, n. 2, p. 147-155, Apr. 1992.

JONSSON, A.; PAHLOW, G. Classificação sistemática e caracterização bioquímica de leveduras crescem em silagem de capim inoculado com *Lactobacillus* culturas. **Animal Research and Development**, Brisbane, v. 20, p. 7-22, 1984.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG JUNIOR, L. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 10, p. 4005-4013, Oct. 2006.

KLEINSCHMIT, D. H.; SCHMIDT, R. J.; KUNG JUNIOR, L. Os efeitos de vários aditivos antifúngicos na fermentação e estabilidade aeróbia da silagem de milho. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 6, p. 2130-2139, June 2005.

KROONEMAN, J. et al. *Lactobacillus diolivorans* sp. Nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, n. 2, p. 639-646, Nov. 2002.

KUNG JUNIOR, L. Effects of microbial additives in silages: facts and perspectives. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 9., 2009, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2009. v. 1, p. 7-22.

KUNG JUNIOR, L. et al. The effect of *Lactobacilos buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of ground and whole high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 5, p. 2309-2314, May 2007.

\_\_\_\_\_. The effect of propionic acid-based preservatives on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 2, p. 1322-1330, Feb. 1998.

\_\_\_\_\_. The effect of wide swathing on wilting times and nutritive value of alfalfa haylage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 4, p. 1770-1773, Apr. 2010.

KUNG JUNIOR, L.; MUCK, R. E. Animal response to silage additives. In: **Silage: field to feedbunk**, NRAES-99. Ithaca: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1997. p. 200-210.

KUNG JUNIOR, L.; RANJIT, N. K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 84, n. 5, p. 1149-1155, May 2001.

KUNG JUNIOR, L.; SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. **Focus on Forage**, Champaign, v. 3, n. 3, p. 1-5, Mar. 2001.

KUNG JUNIOR, L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 251-304.

LAUER, J. **Kernel Milkline**: how should we use it for harvesting silage. Madison: Agronomy Advice, 1999. 608 p.

LAURIAULT, L. M. et al. **Silage microbial inoculants**: use in hot weather conditions. Las Cruces: New Mexico State University, 2009. 8 p. (Circular, 642).

LI, Y.; NISHINO, N. Bacterial and fungal communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus buchneri*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 314-321, Apr. 2011.

LIN, C. et al. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 9, p. 2484-2493, Sept. 1992.

LINDGREN, S.; OLDENBURG, E.; PAHLOW, G. Influência de micróbios e seus metabólitos sobre alimentação e qualidade de alimentos. **Grassland Science in Europe**, Zurich, v. 7, n. 1, p. 503-511, May 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. São Paulo: Pearson, 2010. 608 p.

MALLMANN, C. A. **Fight mycotoxins with strict prevention**. Disponível em: <<http://www.management/mycotoxins.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

MARCINAKOVA, M. et al. New probiotic and bacteriocin-producing strain of *Enterococcus faecium* EF9296 and its use in grass ensiling. **Czech Journal of Animal Science**, Praha, v. 53, n. 2, p. 336-345, Feb. 2008.

MARI, L. J. et al. An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 to alter fermentation and improve the aerobic stability of corn silage in farm silos: short communication. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 3, p. 1174-1176, Mar. 2009.

MCDONALD, P. **The biochemistry of silage**. New York: J. Wiley, 1981. 340 p.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2<sup>nd</sup> ed. Bucks: Chalcombe, 1991. 340 p.

MERRY, R. J. et al. Degradation of fructans by epiphytic and inoculated lactic acid bacteria and by plant enzymes during ensilage of normal and sterile hybrid ryegrass. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 79, n. 6, p. 583-591, June 2008.

MERTENS, D. R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 64, p. 1548-1558, 1987.

MERTENS, D. R.; HALEVI, A. Forage sources and ration formulation systems for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 1, p. 275, 1996. Supplement.

MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, p. 453-460, 1983.

MORAIS, J. P. G. Silagem de gramíneas tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE OVINOS, 7., 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1999. p. 89-95.

MORAN, J. P.; PULLAR, D. O desenvolvimento de um novo inoculante bacteriano para reduzir a deterioração do molde e melhorar o processo de ensilagem na silagem de fardos grandes. In: O'KIELY, P.; O'CONNELL, M.; MURPHY, J. (Ed.). **Investigação silagem de 1993**. Dublin: Dublin University, 1993. p. 85-86.

\_\_\_\_\_. Efeitos de inoculantes de silagem de milho sobre a estabilidade aeróbia. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, Saint Joseph, v. 4, n. 4, p. 1011-1016, Aug. 2004.

MUCK, R. E. Silage fermentation. In: \_\_\_\_\_. **Mixed cultures in biotechnology**. New York: McGraw Hill, 1991. p. 171-204.

\_\_\_\_\_. Silage inoculation: inoculation of silage and its effects on silage quality. In: CONFERENCE WITH DAIRY AND FORAGE INDUSTRIES, 1., 1996, Madison. **Proceedings...** Madison: DFI, 1996. p. 43-51.

\_\_\_\_\_. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 2, p. 183-191, jul. 2010.

MUCK, R.; SHINNERS, K. Conserved forage (silage and hay): progress and priorities. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: USP, 2001. p. 753-762.

NEUMANN, J. N. M. et al. Valor nutritivo de silagens de capim-elefante enriquecidas com subproduto do processamento do maracujá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 4, p. 1843-1849, jul./ago. 2006.

NEUMANN, M. **Parâmetros para análise de qualidade da silagem**.

Disponível em:

<<http://www.iepec.com/curso/listarCapituloPopUp&idCurso=58&idCapitulo=407>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

NEUMANN, M.; MÜHLBACH, P. R. F.; NÖRNBERG, J. L. Características da fermentação da silagem obtida em diferentes tipos de silos sob efeito do tamanho de partícula e da altura de colheita das plantas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 1395-1405, mar./abr. 2007.

NEUMANN, M.; RESTLE, J.; BRONDANI, I. L. Avaliação de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. MOENCH) ou milho (*Zea mays*, L.) na produção do novilho superprecoce. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 3, p. 438-452, 2004.

NISHINO, N. Aerobic stability and instability of silages caused by bacteria. In: INTERNACIONAL SMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro: USP, 2011. 1 CD-ROM.

NISHINO, N. et al. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 800- 807, May 2003.

NOEL, D.; BERKELEY, R. C. W. Gênero *Bacillus*. In: SNEATH, P. H. A. et al. (Ed.). **Manual Bergey de Bacteriologia Sistemática**. New York: Springer, 1986. p. 1105-1139.

OSTLING, C.; LINDGREN, S. Influences of enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silages. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 41-47, Mar. 1995.

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**, Washington, v. 67, n. 1, p. 125-132, Jan. 2001.

\_\_\_\_\_. Silage fermentation processes and their manipulation. In: FAO ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE, 1., 1999, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2000. p. 17-30.

PAHLOW, G. Microbiology of inoculants, crops and silages-small scale silage experiments. In: EUROBAC CONFERENCE, 1., 1986, Lindgren.  
**Proceedings...** Lindgren: University of Animal Science, 1986. p. 45-59.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-94.

PASEBANI, M. et al. Effect of epiphytic lactic acid bacteria isolated from guinea grass on nutritional value of the silages. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 6, n. 6, p. 4447-4450, Sept. 2011.

PEDROSO, S. et al. Características agronômicas e nutricionais de híbridos de milho e suas silagens (*Zea mays L.*). **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 248-258, 2006.

PEREIRA, O. G.; ROCHA K. D.; FERREIRA, C. L. L. F. Composição química, caracterização e quantificação da população de microrganismos em capim-elefante cv. Cameroon (*Pennisetum purpureum*, Schum.) e suas silagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 6, p. 1742-1750, nov./dez. 2007.

RANJIT, N. K.; KUNG JUNIOR, L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 3, p. 526-535, 2000.

RANJIT, N. K.; TAYLOR, C. C.; KUNG JUNIOR, L. Efeito do *Lactobacillus buchneri* 40,788 na fermentação, estabilidade aeróbia e valor nutritivo da silagem de milho. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 73-81, June 2002.

RATANAPIBULSAWAT, C. et al. Screening and characterization of lactic acid bacteria producing antimicrobial substance against *Staphylococcus aureus*. **Kasetsart Journal: Nature Science**, Bancoc, v. 39, n. 2, p. 284-293, May 2005.

REIS, R. A. et al. Efeito de doses de *Lactobacillus buchneri* “CEPA NCIMB 40788” sobre as perdas nos períodos de fermentação e pós-abertura da silagem de grãos úmidos de milho. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 923-934, out./dez. 2008.

ROCHA, K. D. et al. Valor nutritivo de silagens de milho (*Zea mays* L.) produzidas com inoculantes enzimo-bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 2, p. 389-395, mar./abr. 2006.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Efeitos da adição de inoculantes microbianos sobre o perfil fermentativo da silagem de alfafa adicionada de polpa cítrica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 1646-1653, nov./dez. 2004.

ROTZ, C. A.; MUCK, R. E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: FAHEY, G. C. J. et al. (Ed.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 828-868.

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

SANTOS, A. O. **Seleção e avaliação de cepas bacterianas para ensilagem de milho**. 2012. 96 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SANTOS, E. M. et al. Inoculante ativado melhora a silagem de capim-tanzânia. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 57, n. 217, p. 35-42, 2008.

SCHMIDT, P. Improved efficiency of sugarcane ensiling for ruminant supplementation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 9., 2009, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2009. p. 47-72.

SCHMIDT, P. et al. Produtividade, composição morfológica, digestibilidade e perdas no processo de ensilagem de duas variedades de cana-de-açúcar, com e sem adição de uréia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. p. 506-513.

SCHMIDT, R. J.; KUNG JUNIOR, L. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 4, p. 1616-1624, Apr. 2010.

SEALE, D. R. Inoculantes bacterianos como aditivos de silagem. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 61, p. 9-26, 1986. Supplement.

SEGLAR, B. Fermentation analysis and silage quality testing. In: MINNESOTA DAIRY HEALTH CONFERENCE COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE, 1., 2003, Saint Paul. **Proceedings...** Saint Paul: University of Minnesota, 2003. 1 CD-ROM.

SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F.; REIS, R. A. **Instabilidade aeróbia de silagens**: efeitos e possibilidades de prevenção. Jaboticabal: FUNEP, 2005. p. 25-60.

SIQUEIRA, G. R. et al. Associação entre aditivos químicos e bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 4, p. 789-798, jul. 2007.

\_\_\_\_\_. Queima e aditivos químicos e bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 1, p. 103-112, jan./fev. 2010.

SOEST, P. J. van. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2<sup>nd</sup> ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476 p.

SPOELSTRA, S. F.; COURTIN, M. G.; BEERS, J. A. C. van. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 111, p. 127-132, 1988.

STEFANIE, J. W. H. et al. Silage fermentation process and their manipulation. In: FAO ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE, 1., 1999, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2000. p. 17-30.

TAYLOR, C. C.; KUNG JUNIOR, L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 2, p. 1526-1532, June 2002.

THUAULT, D. et al. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 4, p. 1145-1150, Apr. 1991.

VALADARES FILHO, S. C. et al. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 329 p.

WARD, R. Fermentation analysis: use and interpretation. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 3., 2000, Fort Wayne. **Proceedings...** Fort Wayne: DNC, 2000. 1 CD-ROM.

WEINBERG, Z. G. et al. The effect of *Lactobacilos buchneri* and *L. plantarum*, applied at ensiling, on the ensiling fermentation and aerobic stability of wheat and sorghum silages. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 23, n. 3, p. 218-222, Sept. 1999.

WEINBERG, Z. G.; MUCK, R. E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, Haren, v. 19, n. 3, p. 53-68, July 1996.

WHITTENBERG, K. M.; INGALLS, J. R.; DEVLIN, T. J. The effect of lactobacteria inoculation on corn silage preservation and feeding value for growing beef animals and lambs. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 63, p. 917-924, Dec. 1983.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effect of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 101-116, Feb. 1990.

\_\_\_\_\_. **The silage fermentation**. New York: M. Dekker, 1984. 132 p.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P. Genera and species in acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 15-24, June 2008.

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**, Viçosa, MG, v. 38, n. 2, p. 170-189, jul. 2009.