



**SILLAS MAYRON DA SILVA DA SILVA**

**EFEITO DA INOCULAÇÃO COM *Lactobacillus farraginis* E *Lactobacillus buchneri* E  
DO TEMPO DE ESTOCAGEM SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DA SILAGEM DE  
MILHO**

**LAVRAS – MG**

**2019**

**SILLAS MAYRON DA SILVA DA SILVA**

**EFEITO DA INOCULAÇÃO COM *Lactobacillus farraginis* E *Lactobacillus buchneri* E  
DO TEMPO DE ESTOCAGEM SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DA SILAGEM DE  
MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes com ênfase em Avaliação, Produção e Conservação de Forragens, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Prof. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2019**

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

Silva, Sillas Mayron da Silva da.

Efeito da inoculação com *Lactobacillus farraginis* e  
*Lactobacillus buchneri* e do tempo de estocagem sobre as  
características da silagem de milho / Sillas Mayron da Silva da  
Silva. - 2019.

62 p.

Orientador(a): Carla Luiza da Silva Ávila.

Coorientador(a): Thiago Fernandes Bernardes, Rosane Freitas  
Schwan.

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

Bibliografia.

1. Zootecnia. 2. Conservação de forragens. 3. Microbiologia da  
silagem. I. Ávila, Carla Luiza da Silva. II. Bernardes, Thiago

**SILLAS MAYRON DA SILVA DA SILVA**

**EFEITO DA INOCULAÇÃO COM *Lactobacillus farraginis* E *Lactobacillus buchneri* E  
DO TEMPO DE ESTOCAGEM SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DA SILAGEM DE  
MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes com ênfase em Avaliação, Produção e Conservação de Forragens, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

APROVADO em 26 de fevereiro de 2019

Prof. Dr. Thiago Fernandes Bernardes – UFLA/DZO  
Prof. Dr. Thiago Carvalho da Silva – ISPA/UFRA – Campus Belém

Prof. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2019**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por sua bondade e pela gratuidade do dom da vida, agradeço a Ele por me permitir sonhar e viver as oportunidades, na busca do crescimento pessoal, acadêmico e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa e possibilitar o desenvolver e a conclusão da minha dissertação.

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, ao Departamento de Zootecnia/DZO e a toda equipe de colaboradores e servidores. Márcio, nosso técnico e amigo, você faz toda diferença no laboratório, obrigado por se importar com todos nós.

À minha orientadora Carla Ávila, a quem respeito muito por seu caráter e cuidado para com os seus orientados. Você, sem dúvidas é uma pessoa muito empática. Obrigado por toda compreensão ao longo do período do mestrado.

À toda equipe da Micro/Zoo, obrigado. Cada um com muita paciência me ensinaram bastante. Lílian, minha parceira de projeto, obrigado (Só nós sabemos o quanto sentamos para discutir nosso projeto tentando encontrar a melhor estratégia para o nosso experimento). A todos os ICs, muito obrigado pela ajuda. Obrigado Bia e Gustavo, pela grande ajuda com as análises da microbiologia. Rafael obrigado pelos incansáveis “Helps” prestados. Daviane (Davis), você sem dúvidas foi um ser iluminado em nossa equipe, obrigado pelos conselhos e ensinamentos, aprendi muito mais do que o acadêmico com você, obrigado querida amiga. Obrigado a tantos outros que conheci na microbiologia agrícola, pelo companheirismo e ajuda com as atividades.

Aos companheiros do núcleo de estudos em forragicultura – NEFOR, reconhecido dentro e fora da UFLA, por sua competência na pesquisa. Jéssica Gusmão, uma amiga especial, obrigado por está comigo desde minha graduação. Fernanda Gomes, obrigado pelas horas de prosa e pelos bons conselhos para a vida, você é uma querida amiga. Marcus, Marcim, Bianca (Biboca), Luciana (obrigado por estar sempre disposta a ajudar), Sérgio (obrigado por facilitar e compartilhar seus conhecimentos com a estatística), entre tantos outros amigos que o NEFOR meu deu, quero deixar meu obrigado.

Aos meus pais Antônio e Cícera, obrigado pelo apoio em que sempre posso contar. Amo vocês! A minha irmã Mayara, por acreditar tanto em mim e pelo encorajamento. Aos meus amados sobrinhos, que na singularidade de sua inocência sempre me perguntavam se podiam vir me visitar ou até mesmo quando eu retornaria para casa.

Aos amigos que Lavras me proporcionou, Pedro (Companheiro de jornada acadêmica, obrigado por ser sempre presente), Karen (Obrigado por se importar tanto), Daniela de Paula (obrigado por acreditar tanto), Jonas (o melhor ouvinte e conselheiro), Matheus (minha ajuda instantânea) e Filipe (obrigado pelas boas ideias e amizade). Vocês se tornaram os amigos de minhas antigas orações, agradeço a Deus pela vida de todos vocês. Carla Resueno (a alegria de viver), que mesmo longe, não se cansou em saber como estava a minha lida, obrigado pela motivação.

Aos amigos da UFLA, da lida diária de estudos e das rotinas de laboratório, gratidão é uma palavra que vem à cabeça ao lembrar de cada um de vocês. Jéssica Resende e Jéssica Barbosa, vocês são seres de Luz, obrigado pela amizade e apoio ao longo da jornada.

À querida professora Gracita, agradeço pelo apoio desde a graduação, você sem dúvidas foi uma das melhores pessoas que conheci na vida, obrigado pelos conselhos e encorajamento.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito obrigado!**

*“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e seus planos serão bem-sucedidos. ”*  
*Pv-16:3*

## RESUMO GERAL

A cultura do milho possui características que contribuem para sua ensilagem devido algumas particularidades que influenciam diretamente na qualidade da fermentação da massa ensilada como, concentração de matéria seca (MS) no momento do corte, baixo poder tamponante e adequada concentração de carboidratos solúveis. Contudo, essas silagens são propensas à deterioração aeróbia quando expostas ao oxigênio, devido à utilização de açúcares remanescentes pelos microrganismos deterioradores. O objetivo desse estudo foi avaliar cepas epifíticas da planta de milho pertencentes ao grupo *Lactobacillus buchneri*, por meio do perfil fermentativo e estabilidade aeróbia em diferentes tempos de estocagem. Os tratamentos foram avaliados em um delineamento completamente casualizado em esquema fatorial (3 x 4) com três repetições, que consistiram em: i) Silagem de milho sem inoculação (CON), ii) Silagem de milho inoculada com *Lactobacillus farraginis* (Taxa de aplicação 8 log UFC g<sup>-1</sup>), iii) Silagem de milho inoculada com *Lactobacillus buchneri* (Taxa de aplicação 5 log UFC g<sup>-1</sup>), e os tempos de estocagem com 0, 29, 103 e 193 dias. As silagens foram avaliadas quanto aos produtos finais da fermentação, contagem microbiana, valor nutritivo e estabilidade aeróbia. Os dados foram analisados usando a função *fat2.dic* do pacote *ExpDes.pt* do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2019). Dois contrastes foram testados para comparar: i) CON vs. *L. farraginis*, ii) CON vs. *L. buchneri*. Significância foi declarada com  $P < 0,05$ . Todas as silagens foram bem conservadas, com valores de pH, em geral mais baixos para as silagens CON ( $P < 0,001$ ). No entanto, as silagens inoculadas tiveram as maiores concentrações de ácido acético e 1,2-propanodiol ( $P < 0,001$ ) o que comprova o estabelecimento das BAL inoculadas. Aos 29 dias, a silagem inoculada com *L. farraginis* apresentou a menor população de leveduras ( $P < 0,001$ ). A população de fungos diferiu no tempo, obtendo maiores contagens com 103 dias de estocagem ( $P < 0,001$ ). As perdas de MS para os tempos de estocagem não diferiram significativamente entre os tratamentos. A estabilidade aeróbia aos 29 ( $P < 0,001$ ) e 193 ( $P < 0,05$ ) dias foram mais longas para a silagem inoculada com a cepa *L. farraginis*. Dentre os tempos de estocagem avaliados a cepa de *Lactobacillus farraginis* se destaca pela rápida e eficiente produção de ácido acético e aumento da estabilidade aeróbia desde o primeiro tempo de abertura (29 dias), podendo ser utilizada em fazendas que necessitem realizar o desabastecimento dos silos com pouco tempo de estocagem.

**Palavras chave:** estabilidade aeróbia, fermentação heterolática, inoculante microbiano, perfil fermentativo.

## GENERAL ABSTRACT

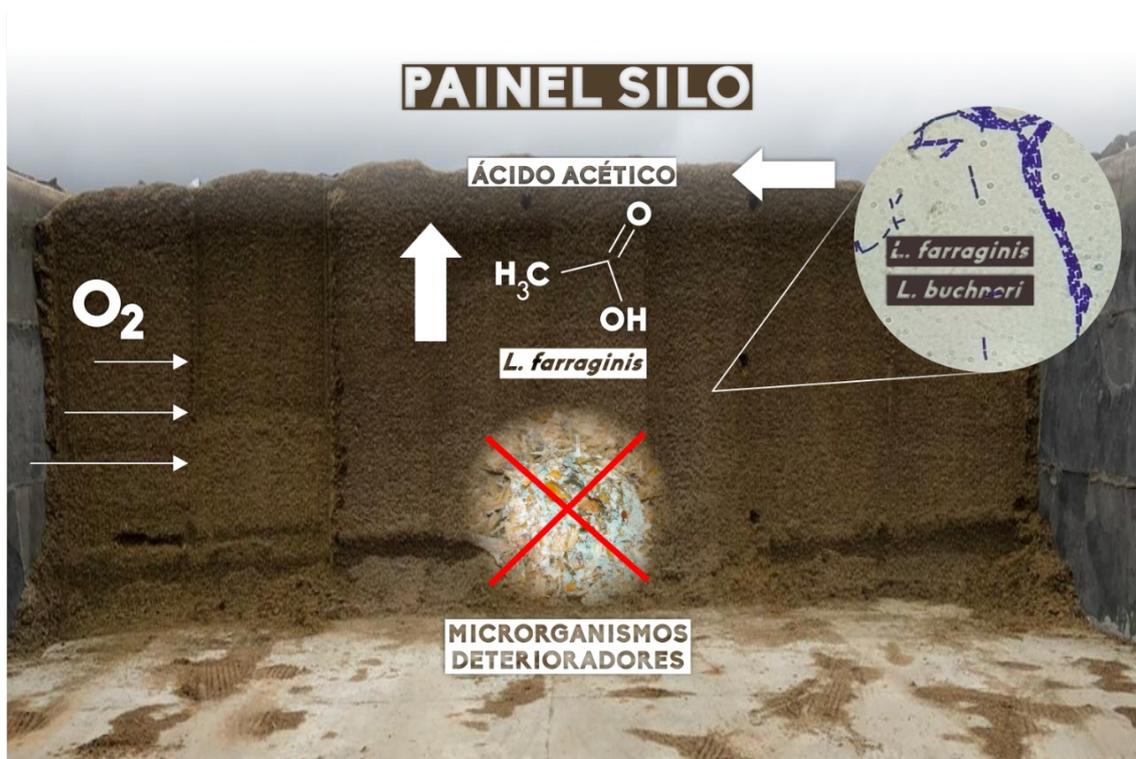
The corn crop has characteristics that contribute to its silage due to some particularities that influences directly in the quality of the ensiled mass fermentation such as dry matter (DM) concentration at the cutting time, low buffering power and adequate soluble carbohydrates concentration. However, those silages are prone to aerobic deterioration when exposed to oxygen due to the remaining sugar used by deteriorating microorganisms. The aim of these study is to evaluate epiphytic strains from corn plants that belongs to the *Lactobacillus buchneri* group, using means as fermentative profile and aerobic stability in different storage times. The treatments were evaluated in a completely randomized design as factor scheme (3 x 4) using three replications which were consisted in: i) Corn silage with no inoculation at all (CON), ii) Corn silage inoculated using *Lactobacillus farraginis* (application rate 8 log CFU g<sup>-1</sup>) iii) Corn silage inoculated using *Lactobacillus buchneri* (application rate 5 log CFU g<sup>-1</sup>), and storage times of 0, 29, 103 and 193 days. The Silages were evaluated in for their final fermentation products, microbial counts, nutritive value and aerobic stability. The data were analyzed using *fat2.dic* function of the *ExpDes.pt* package from the R statistic software (R CORE TEAM, 2019). Two contrasts were tested for comparison purposes: i) CON vs. *L. farraginis*, ii) CON vs. *L. buchneri*. Significance was declared as  $P < 0,05$ . All the silages were properly stocked, with pH values in general lower on the silages CON ( $P < 0,001$ ). However, the inoculated silages had bigger concentrations of acetic acid and 1,2-propanediol ( $P < 0,001$ ) which proves the LAB inoculated establish. At 29 days, the *L. farraginis* inoculated silage presented the lowest yeast population ( $P < 0,001$ ). The molds population differed in time, obtaining greater counts in 103 stocking days ( $P < 0,001$ ). The DM losses in the storage time did not differ significantly between those treatments. The Aerobic stability at days 29 ( $P < 0,001$ ) days and 193 ( $P < 0,05$ ) were longer for the *L. farraginis* inoculated silage. Between the evaluated storage time of *L. farraginis* strains is characterized by the both fast and efficient acetic acid production and the increase in the aerobic stability since the first opening (29 days), being able to be used on farms that have a necessity of making the silos shortage with low storage time.

**Key words:** aerobic stability, fermentative profile, heterolatic fermentation, microbial inoculant.

## RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

O uso de bactérias lácticas como aditivos para melhorar a qualidade das silagens deve levar em consideração a interação entre o microrganismo e espécie forrageira. As cepas expressam efeitos acentuados quando inoculadas na planta forrageira da qual compõem a população epifítica. Dessa forma, tem-se buscado cepas eficientes para serem inoculadas na silagem de milho. O milho apresenta características favoráveis para ser utilizado como silagem, devido as concentrações adequadas de carboidratos solúveis e teor de matéria seca durante a colheita. No entanto, problemas com estabilidade aeróbia são observados devido o oxigênio favorecer o crescimento de microrganismos deterioradores que consomem os açúcares remanescentes da fermentação.

Neste estudo, foram testadas duas cepas epifíticas de bactérias lácticas heterofermentativas isoladas da planta de milho com espécies de *Lactobacillus farraginis* e *Lactobacillus buchneri*. Ambas as cepas foram avaliadas quanto ao perfil de fermentação, estabilidade aeróbia das silagens e perdas de matéria seca durante a estocagem. As silagens avaliadas apresentaram perfil fermentativo semelhantes, assim como as perdas de matéria seca durante a estocagem. A cepa *Lactobacillus farraginis* se destaca pela rapidez de produção e pela concentração de ácido acético que inibe o crescimento de microrganismos deterioradores. A cepa de *Lactobacillus farraginis* pode ser recomendada para fazendas que tenham necessidade de realizar rápida abertura dos silos.



Cepas epifíticas de *Lactobacillus farraginis* e *Lactobacillus buchneri* sobre o perfil de fermentação e estabilidade aeróbia de silagem de milho.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Variação da temperatura durante a estabilidade aeróbia das silagens de milho com e sem inoculação após 29 dias de estocagem.....51

**Figura 2** – Variação da temperatura durante a estabilidade aeróbia das silagens de milho com e sem inoculação após 193 dias de estocagem.....51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Caracterização da composição química, microbiana e física da planta inteira de milho antes de ensilar.....	45
<b>Tabela 2</b> – Probabilidade dos efeitos ( <i>P</i> ) de silagens, tempos de estocagem e interação destes fatores sobre as características de silagens de milho.....	46
<b>Tabela 3</b> – Efeito das silagens dentro de cada tempo de estocagem sobre a composição química e população microbiana.....	47
<b>Tabela 4</b> – Efeito das silagens sobre o perfil fermentativo.....	49
<b>Tabela 5</b> – Efeito do tempo de estocagem sobre as características das silagens.....	50

## SUMÁRIO

<b>RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO .....</b>	<b>09</b>
<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Silagem de milho.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Processo de ensilagem.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Microbiota envolvida no processo de ensilagem.....</b>	<b>18</b>
2.3.1. Bactérias ácido láticas (BAL).....	19
2.3.2. Bactérias ácido propiônicas (BAP).....	20
2.3.3. Gênero <i>Clostridium</i> .....	20
2.3.4. Gênero <i>Bacillus</i> .....	21
2.3.5. Gênero <i>Listeria</i> .....	22
2.3.6. Enterobactérias.....	23
2.3.7. Leveduras e fungos filamentosos.....	24
<b>2.4. Inoculantes bacterianos.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5. Estabilidade aeróbia em silagens.....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>
<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>36</b>
<b>ARTIGO: Efeito da inoculação com <i>Lactobacillus farraginis</i> e <i>Lactobacillus buchneri</i> e do tempo de estocagem sobre as características da silagem de milho.....</b>	<b>36</b>
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
2.1. Inoculantes.....	41
2.2. Ensilagem.....	41
2.3. Perfil fermentativo.....	42
2.4. Análise microbiológica.....	42
2.5. Análise química.....	43
2.6. Estabilidade aeróbia.....	43
2.7. Análise estatística.....	43
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>

4. DISCUSSÃO.....	52
5. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

A produção de silagem tem se intensificado desde a década de 1940, como resultado das melhorias aplicadas na tecnologia de mecanização da colheita de forragem (WILKINSON et al., 2003). Desde então, as mudanças e transformações bioquímicas que ocorrem na planta forrageira antes e após a ensilagem são de interesse de pesquisas em todo o mundo. Para garantir a maximização da produção de silagem e manutenção de suas características nutricionais, avanços científicos e tecnológicos são desenvolvidos. Dentre os quais, destacam-se o melhoramento das plantas forrageiras, a compreensão do momento ideal de corte, estruturas de estocagem e o desenvolvimento na produção de inoculantes microbianos específicos para a silagem (WILKINSON et al., 2003; MAHANNA; CHASE, 2003; BERNARDES et al., 2018).

A cultura do milho (*Zea mays* L.) se destaca por ser a mais utilizada em grande parte do mundo para o processo de ensilagem, devido as características favoráveis de ensilabilidade, como teor de matéria seca (MS) adequado, concentrações suficientes de carboidratos solúveis em água (CSA) e baixo poder tamponante, além de demonstrar grande aceitabilidade pelos animais (ALLEN et al., 2003; KHAN et al., 2015).

Contudo, silagens de milho são propensas à deterioração aeróbia e crescimento de microrganismos oportunistas e na maioria das silagens, as leveduras são iniciadoras da deterioração aeróbia devido a capacidade de crescerem em baixo pH, assim como algumas espécies de fungos (PAULUSSEN et al., 2016). Os inoculantes são eficientes em aprimorar o processo de fermentação com perdas mínimas, quando utilizado bactérias lácticas homofermentativas, ou ainda, o uso de bactérias lácticas heterofermentativas que desempenham a função de manter a qualidade da massa ensilada por muito mais tempo durante a fase de exposição aeróbia (RANJIT; KUNG Jr, 2000; DRIEHUIS et al., 2001; KLEINSCHMIT; KUNG Jr, 2006; MUCK et al., 2018; GALLO et al., 2018), podendo em alguns casos dispor de efeitos vantajosos sobre a ingestão de silagem, digestibilidade do nutriente ruminal e desempenho animal (WEISS et al., 2016).

Dessa forma, a seleção de cepas específicas para utilização como inoculantes é necessária e a opção pelo uso e a escolha do tipo do inoculante deve ser determinado pelos desafios que a forragem apresenta ao ser ensilada (KUNG Jr et al., 2003). A seleção de novas cepas é um processo demorado, com grande número de isolados, testes em laboratório e com ensilagem em escalas experimentais até que se identifique a melhor cepa para melhorar as características que

se busca solucionar com as silagens. Com isso, para a silagem de milho busca-se cepas com potencial de produção de outros ácidos como exemplo, ácido acético e propiônico que permitam maior tempo de exposição aeróbia devido a inibição de microrganismos deterioradores.

Portanto, a hipótese deste trabalho é que a utilização da cepa de *Lactobacillus farraginis* selecionado especificamente para o milho melhora as características microbiológicas e a estabilidade aeróbia da silagem, podendo o efeito do inoculante depender do tempo de estocagem. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil fermentativo das silagens inoculadas com as cepas *L. farraginis* e *L. buchneri*, avaliar a inibição do desenvolvimento dos microrganismos indesejáveis e a estabilidade aeróbia

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Silagem de milho

A silagem de milho no Brasil é a principal fonte de forragem utilizada durante todo o ano em sistemas de confinamento e durante alguns períodos do ano em sistemas de pastejo (BERNARDES et al., 2015). Isso ocorre devido a planta de milho expressar características favoráveis ao processo de ensilagem, como elevado potencial de produção de matéria seca (MS), elevado valor nutritivo e alta ensilabilidade (ALLEN et al., 2003). Além disso, também apresenta vantagens no processo de colheita e de manipulação da mecanização no momento da ensilagem (BERNARDES et al., 2015).

A cultura do milho possui alta ensilabilidade devido algumas particularidades que influenciam diretamente na qualidade da fermentação da massa ensilada, assim como, concentração de MS no momento do corte, baixo poder tamponante e adequada concentração de carboidratos solúveis (BUXTON; O'KIELY, 2003). As plantas de milho também são consideradas uma cultura bastante flexível quanto a sua utilização, podendo ser manipulada para a confecção de silagem de planta inteira ou silagem de grãos (BERNARDES et al., 2012).

As fases iniciais de fermentação da silagem de milho geralmente ocorrem de forma satisfatória, quando colhido na época correta, compactado e vedado de forma adequada. No entanto, um importante fator pesa em relação a qualidade da silagem, devido a mesma ser propensa a deterioração aeróbia quando exposta ao ar, principalmente em clima quente (ASHBELL et al., 2002; BERNARDES; ADESOGAN, 2012). A silagem de milho é considerada um alimento nobre devido ao seu elevado valor nutritivo e elevado custo de produção de MS. Com isso, os cuidados com essas silagens devem ser criteriosos no período pós abertura dos silos, devido a instabilidade aeróbia que ocorre em função da maior concentração de substratos fermentescíveis por microrganismos oportunistas (SIQUEIRA et al., 2005).

Após a abertura do silo, inevitavelmente o oxigênio entra em contato com a massa ensilada propiciando o crescimento de microrganismos indesejáveis. As leveduras, microrganismos ácido tolerantes, iniciam o processo de deterioração da silagem por meio da utilização dos açúcares residuais e do ácido lático como substrato para o seu crescimento. Ocasionalmente por meio da oxidação dos componentes presentes na silagem a produção de calor, aumento da temperatura e de pH (PAHLOW et al., 2003). Além do mais, essas silagens também podem conter baixa quantidade de produtos inibidores de microrganismos deterioradores, como exemplo o ácido acético (TABACCO et al., 2009).

## 2.2 Processo de ensilagem

A utilização dos recursos forrageiros na forma de silagem é caracterizada pela fermentação láctica que ocorre em ambiente anaeróbio pela ação dos principais agentes fermentadores que são as bactérias lácticas. Estes microrganismos utilizam como substrato para o seu metabolismo os açúcares presentes na massa a qual foi ensilada e a partir disso, produzem o ácido láctico. Assim sendo, a contínua manutenção da anaerobiose e queda de pH integram os fatores que são responsáveis pela preservação da forragem (DRIEHUIS et al., 1999; PAHLOW et al., 2003; MUCK, 2010). Os microrganismos que são capazes de deteriorar a silagem são inibidos pelo efeito dos ácidos que são produzidos durante a fermentação, pela pressão osmótica elevada e ausência de oxigênio (WOOLFORD, 1990).

O principal objetivo do processo de ensilagem é conservar a planta forrageira durante o período em que será fornecida para os animais ruminantes, apresentando perdas mínimas referente ao seu valor nutritivo (DUNIÈRE et al., 2013). O processo de ensilagem é dividido em quatro etapas distintas que são compreendidas pela fase aeróbia, fase de fermentação ativa, fase estável e fase de desabastecimento (WEINBERG; MUCK, 1996).

A fase aeróbia refere-se ao momento do abastecimento do silo até algumas horas após a vedação da estrutura onde a massa foi ensilada. Nesse intervalo de tempo entre abastecimento e vedação ocorre aumento de temperatura e redução do oxigênio atmosférico como resultado da respiração celular da planta e dos microrganismos aeróbios. Nesta fase, as enzimas da planta, sendo elas, carboidrase e proteases ainda estão ativas devido o pH do meio se encontrar na faixa de 6,0 a 6,5 sendo comum para as plantas forrageiras frescas (McDONALD et al., 1991).

A fase de fermentação ativa é caracterizada pela ausência de oxigênio e sua duração varia de acordo com as características da planta e das condições da ensilagem, variando entre 7 a 45 dias (MUCK; PITT, 1993; PAHLOW et al., 2003). Nessa fase, pode ocorrer a competição por nutrientes entre as bactérias ácido lácticas (BAL) e os microrganismos anaeróbios obrigatórios e facultativos (PAHLOW et al., 2003). Durante essa etapa do processo ocorre primordialmente a proliferação de enterobactérias, seguidas de BAL homofermentativa que são mais eficientes na produção de ácido láctico, sendo de fundamental importância para conservação da massa ensilada (PEREIRA et al., 2004; SANTOS et al., 2013). Neste processo as BAL heteroláticas também crescem, sendo menos eficientes no abaixamento de pH devido a geração de outros produtos oriundos de seu metabolismo, como etanol, ácido acético e CO<sub>2</sub>.

A fase estável é definida pela diminuição do processo fermentativo, que corresponde ao momento onde não ocorre grandes mudanças desde que a silagem esteja bem vedada e com

ausência de oxigênio. A quantidade de bactérias anaeróbias decresce com a redução do pH decorrente da fase de fermentação e os microrganismos ácidos tolerantes resistem em um estado quase inativo, como é o caso de algumas espécies de leveduras ou por meio da formação de esporos de *Bacillus* e *Clostridium* (PAHLOW et al., 2003).

A última fase que é compreendida pelo desabastecimento do silo ou abertura é quando o material que foi ensilado fica exposto ao oxigênio atmosférico o que favorece o desenvolvimento de microrganismos aeróbios indesejáveis (DRIEHUIS; OUED ELFERINK, 2000). A deterioração aeróbia da silagem se inicia através da degradação de ácidos orgânicos por leveduras e bactérias do ácido acético que proporcionam aumento de temperatura e pH, contribuindo para o crescimento de outros microrganismos indesejáveis como enterobactérias e fungos filamentosos (OUDE ELFERINK et al., 2000).

Medidas de manejo devem ser muito bem planejadas para se evitar falhas, para que se possa controlar cada fase durante o processo de ensilagem. Desde a primeira fase deve-se utilizar a combinação de procedimentos durante o abastecimento do silo para minimizar o oxigênio presente entre as partículas da massa que está sendo ensilada, evitando as perdas de carboidratos solúveis na respiração aeróbia por parte das plantas e os deixando disponíveis para a fermentação anaeróbia seguido da formação do ácido lático. As duas fases posteriores não podem ser controladas diretamente, entretanto, como medidas preventivas que auxiliam o processo fermentativo pode-se fazer uso de aditivos, que são aplicados durante o abastecimento do silo. A última etapa que é conhecida pelo desabastecimento do silo e fornecimento da silagem aos animais, salienta-se como uma das fases de grande importância, devido a taxa de retirada da silagem ser um fator que pode prevenir as perdas durante o período pós abertura quando em exposição ao ar atmosférico (OUDE ELFERINK et al., 2000).

### **2.3 Microbiota envolvida no processo de ensilagem**

A microbiota da silagem exerce papel fundamental na qualidade do processo de conservação de forragens, portanto, se faz necessário o estudo e entendimento das interações entre os microrganismos que estão presentes durante o processo fermentativo da massa ensilada. A microbiota pode ser dividida em desejáveis e indesejáveis, podendo esses grupos variar de acordo com o tipo de silagem. A bactérias ácido lácticas (BAL) e bactérias do ácido propiônico (BAP) são, por exemplo, desejáveis para uma silagem de milho. Os microrganismos indesejáveis, estão associados com as perdas durante a ensilagem, promovido pela deterioração

anaeróbia ou aeróbia, além de afetar o consumo e desempenho dos animais e causando danos à saúde animal e humana (DUNIÈRE et al., 2013).

### 2.3.1 Bactérias do ácido lático (BAL)

As bactérias ácido lácticas correspondem ao principal grupo de microrganismos que atuam no processo fermentativo. Essas bactérias são gram-positivas, microaerofílicas não formadoras de esporos que podem se apresentar na forma de bastonetes ou cocos. Elas podem crescer em uma ampla faixa de temperatura e baixas condições de pH e apresentam também baixa motilidade (PANG et al., 2011a).

A necessidade nutricional desses microrganismos é complexa, exigindo vários aminoácidos e proteínas para que possam crescer (PAHLOW et al., 2003). Para este grupo, destacam-se os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*, dos quais podem ser identificados diferentes espécies durante o processo fermentativo (ÁVILA, 2007). Contudo, os gêneros comuns no estágio inicial da fermentação são *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, que contribuem para a acidificação inicial do ambiente. Posteriormente, ocorre colonização do gênero *Lactobacillus*, cujos representantes são mais tolerantes à acidez. (SANTOS et al., 2013).

As BAL inibem a maioria dos outros microrganismos pela promoção da queda do pH, no entanto existem outros mecanismos de inibição. Algumas espécies de BAL possuem peptídeos antimicrobianos conhecidos como bacteriocinas que são capazes de inibir o crescimento de algumas bactérias com exigências nutricionais similares. As bacteriocinas interagem com um receptor na membrana celular de bactérias gram-positivas, ocasionando uma força próton-motora resultando na formação de poros e em consequência disso, perda da viabilidade celular. Este processo de exposição da célula não ocorre para bactérias gram-negativas devido as mesmas possuírem a membrana externa, fazendo com que a ação da bacteriocinas seja limitada (ENNHAR et al., 2000). Algumas espécies de BAL também podem se desenvolver em ambiente aeróbio, porém, em tal situação as mesmas produzem peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que pode inibir o crescimento de outros microrganismos ou até mesmo das próprias BAL quando produzido excessivamente (CONDON, 1987; MUCK, 2010).

O ácido lático é o principal produto metabólico derivado da fermentação por parte das BAL, contudo, as bactérias ácido lácticas também podem formar outros produtos oriundos de seu metabolismo como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), ácido acético e etanol. A partir dessa variável

produção de metabólitos das BAL torna-se possível subdividi-las em três grupos, sendo BAL homofermentativas, heterofermentativas obrigatória e heterofermentativas facultativa.

As BAL homofermentativa, fermentam hexoses pela via de Embden-Meyerhorf-Parnas (EMP) ou Via Glicolítica (VG) e obtém como produto de seu metabolismo quase que exclusivamente apenas o ácido láctico. Elas não são capazes de fermentar pentose, devido possuir apenas a enzima aldolase que é responsável em quebrar frutose bifosfato em triose fosfato. As bactérias ácido lácticas heterofermentativas utilizam hexoses pela via fosfoquetolase e também são eficientes na fermentação de pentoses, produzindo ácido láctico, acético, etanol e CO<sub>2</sub>. Devido a semelhança com as bactérias ácido lácticas homofermentativa, as BAL heterofermentativas facultativas conseguem fermentar hexoses em ácido láctico, entretanto, também são capazes de fermentar pentoses em ácido láctico e acético, uma vez que possuem as enzimas aldolase e fosfoquetolase (ÁVILA, 2007; WHITE, 2011).

### **2.3.2 Bactérias ácido propiônico (BAP)**

As bactérias produtoras de ácido propiônico são gram-positiva são anaeróbias obrigatórias ou facultativas, não são esporulantes e nem móveis, sua característica morfológica é apresentada em forma de bastonetes curtos ou de cocos (KIATPAPAN; MUROOKA, 2002). As BAP adquirem energia por meio da fermentação de açúcares e de ácido láctico e produzem ácido propiônico, acético e dióxido de carbono (MOON, 1993). A sobrevivência das BAP ainda é pouco conhecida e mais estudos devem ser intensificados. No entanto é conhecido os efeitos do ácido propiônico e o mesmo tem sido bastante utilizado no intuito de reduzir as perdas associadas ao rompimento da estabilidade aeróbia devido sua ação antifúngica, inibindo os principais microrganismos presentes na deterioração aeróbia, os quais são leveduras e fungos filamentosos (LINDGREN et al., 1985).

### **2.3.3 Gênero *Clostridium***

Os microrganismos do gênero *Clostridium* são bactérias gram-positivas, são anaeróbios obrigatórios e produzem esporos. Eles surgem na silagem a partir de contaminações oriundas do solo ou de outros agentes externos, sendo assim, não fazem parte da microbiota epifítica das culturas. A atividade de clostrídeos na silagem apenas acontece quando o crescimento de BAL e a redução do pH não são eficientes possibilitando a contaminação por microrganismos indesejáveis (FLYTHER; RUSSEL, 2004; ÁVILA, 2007; MUCK, 2010).

Os clostrídeos fermentam os açúcares, ácido láctico e aminoácidos e como produtos de sua fermentação são produzidos ácido butírico, amins biogênicas e amônia, gerando perdas de MS, aumento de pH e redução da palatabilidade da silagem (MAHANNA, 1994; OUDE ELFERINK, 2001; PAHLOW et al., 2003; ÁVILA, 2007; DRIEHUIS et al., 2018). Essas bactérias em condições menos propícias para o seu desenvolvimento formam esporos, que são estruturas que lhes conferem alta resistência as intempéries químicas e físicas do ambiente, o que possibilita que o esporo sobreviva a passagem pelo trato gastrointestinal dos animais, principalmente em animais leiteiros, que facilmente podem vir a contaminar o leite por meio das fezes nas instalações ou por mal higienização dos tratadores. Uma vez que o leite se torna contaminado por esporos de clostrídeos, o resultado é acarretado em diversos danos na qualidade dos derivados do leite, mesmo que seja submetido a tratamentos na indústria de laticínios (MAGNUSSON ET AL., 2006; VISSERS ET AL., 2007A; DRIEHUIS ET AL., 2018).

As espécies mais importantes desse gênero podem ser classificadas em duas divisões de acordo com os principais compostos utilizados na fermentação os quais são, clostrídeos sacarolíticos e proteolíticos. Os pertencentes ao grupo dos sacarolíticos produzem ácido butírico, ácido acético, CO<sub>2</sub> e hidrogênio por meio do catabolismo de carboidratos e ácidos orgânicos, em especial o ácido láctico. Quanto aos clostrídeos proteolíticos, estes produzem através do catabolismo de aminoácidos, gerando produtos como CO<sub>2</sub>, amônia e amins biogênicas (MUCK, 2010).

A atividade metabólica desses dois grupos de clostrídeos afeta de forma negativa a qualidade da silagem devido o aumento das concentrações de amina causar a redução de consumo da silagem por parte dos animais ruminantes (BOLSEN, 1995). Um outro aspecto negativo gerado pela contaminação desses microrganismos é a concentração elevada de ácido butírico que pode causar diminuição do consumo e a absorção do ácido butírico do rúmen para o sangue pode aumentar os riscos de cetose clínica em vacas leiteiras, principalmente aquelas em fase de transição (MUCK, 2010; DRIEHUIS et al., 2018) e também, devido a fermentação do ácido láctico em butírico poder gerar perdas em torno de 51% na MS da silagem (McDONALD et al., 1991).

#### **2.3.4 Gênero *Bacillus***

As características relacionados as bactérias deste grupo são parede gram-positiva e por serem microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, sua estrutura celular é em forma de

bastonete e também possuem capacidade de locomoção e esporulação. Algumas espécies são indesejáveis por auxiliar o processo de deterioração aeróbia das silagens devido a degradação de carboidratos, formando ácidos orgânicos, 2,3-butanodiol, álcoois e glicerol, sendo capazes também, de produzir ácido lático e acético, porém de forma menos eficiente (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Os *Bacillus* atuam no processo de deterioração da silagem em uma faixa de pH superior a 4,5 sendo possível devido ação anterior de bactérias do ácido acético e das leveduras (McDONALD et al., 1991; MUCK; PITT, 1994). Nas silagens, as principais espécies identificadas são de *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis* e *B. polymyx* (TE GIFFEL et al., 2002; DRIEHUIS et al., 2013; DRIEHUIS et al., 2018), sendo a espécie *B. cereus* a que impõe grande importância devido ser causadora de intoxicações alimentares em produtos lácteos, tendo como um dos principais vetores a silagem de milho (VISSERS et al., 2007a; ABEE et al., 2011; DRIEHUIS et al., 2018).

Os *Bacillus*, resistem a passagem no trato gastrointestinal dos ruminantes e são excretados nas fezes na forma de esporos, igualmente as bactérias do gênero *Clostridium* e com isso, podem acarretar em contaminação do leite aumentando as chances de riscos de intoxicação alimentar aos humanos devido ao possível consumo contaminado do leite e de seus derivados (TE GIFFEL et al., 2002; DRIEHUIS et al., 2018).

Embora a presença deste gênero possa ser considerada indesejável em silagens, alguns estudos recentes têm avaliado a utilização da espécie *Bacillus subtilis* em inoculantes devido a sua potencialidade em produzir metabólitos com atividade antifúngica e antibacteriana (TODOVORA; KOZHUHAROVA, 2009; LARA et al., 2016), permitindo assim, a utilização destes inoculantes como ferramenta alternativa para o controle da deterioração aeróbia em silagens (BASSO et al., 2012).

### **2.3.5 Gênero *Listeria***

O gênero *Listeria* possui como características parede celular gram-positiva, são anaeróbios facultativos, não são microrganismos formadores de esporos e apresentam também capacidade locomotiva. Este grupo de bactérias é facilmente encontrado em ambientes aquáticos, no solo, na matéria orgânica e na silagem, devido resistirem as condições adversas como alta concentração de sal, baixo pH e baixas temperaturas (HASSAN et al., 2001).

Das seis espécies que compõe este grupo, destaca-se a espécie *L. monocytogenes* que é responsável por causar a listeriose em diversos animais e humanos por meio de infecções

alimentares com alto índice de mortalidade, resultando em algumas manifestações clínicas como abortos, encefalite e septicemia (DRIEHUIS et al., 2018). Em humanos, muitas vezes a contaminação ocorre pelo consumo de leite não pasteurizado oriundo de animais infectados (DUNIÈRE et al., 2013; DRIEHUIS et al., 2018).

A silagem contaminada, resultante de uma má conservação é a principal fonte de infecção dessas bactérias em animais ruminantes (WIEDMANN, 2003). Um aspecto importante da *Listeria* na silagem é a sua capacidade de sobrevivência a ambientes bastantes adversos, suportando acidez com pH na faixa de 4 e com alta variação de temperatura em torno de 0 a 45 °C (ABBAS; JABBER, 2010; DRIEHUIS et al., 2018). Com isso, se faz necessário a execução de práticas adequadas no processo de ensilagem para que se possa garantir a rápida redução de pH e boa compactação da massa para expulsão do oxigênio e consequente inibição desses microrganismos.

### **2.3.6 Enterobactérias**

As enterobactérias possuem parede celular gram-negativa e são microrganismos anaeróbios facultativos e não possuem capacidade de esporulação. Boa parte dessas bactérias encontradas em silagens não são consideradas patogênicas (REVERBERI et al., 2010; MALLMANN, 2012), mesmo assim, são indesejáveis por serem competidoras das BAL na utilização de açúcares disponíveis.

Essas bactérias, além da capacidade de degradar proteínas também podem provocar redução de consumo alimentar dos animais devido o baixo valor nutricional da silagem por meio da produção de aminas e ácidos graxos que são compostos tóxicos. Podem também aumentar a capacidade tamponante pela formação de amônia a partir de proteínas, condicionando a uma lenta redução de pH e com reflexos negativos no processo fermentativo da silagem e consequentemente perdas de MS (McDONALD, 1991; MUCK, 2010).

A *Escherichia coli* é uma das espécies mais importantes deste grupo de microrganismos. Embora não seja muito comum em silagens e por não ser patogênica em sua grande maioria, porém, algumas cepas podem causar severas enterites oriundas da falta de higiene alimentar. A *Escherichia coli* O157:H7 é um dos severos patógenos pertencentes a este grupo de microrganismos, e pode ser encontrado em silagens de milho mal conservadas e com pH acima do padrão (CERNICCHIARO et al., 2009; OGUNADE et al., 2016; OGUNADE et al., 2017; DRIEHUIS et al., 2018).

### 2.3.7 Leveduras e fungos filamentosos

As leveduras são microrganismos eucariotos, anaeróbios facultativos e são considerados os mais encontrados entre os grupos de microrganismos indesejáveis na silagem e estão relacionados com o início do processo de deterioração aeróbia (PAHLOW et al., 2003; BORREANI et al., 2018). Geralmente, deve-se ao fato de serem os primeiros a se desenvolverem na presença de oxigênio em contato com a massa que foi ensilada durante o processo de armazenamento, possibilitando seu crescimento em faixas de pH variando entre 3,5 a 6,5 (McDONALD, 1991). Em condições anaeróbias, as leveduras fermentam os açúcares em etanol e CO<sub>2</sub> (DEACON, 2005) e ao consumirem o ácido lático eram produtos como CO<sub>2</sub> e água o que acarreta em aumento do pH da silagem e favorecendo o desenvolvimento de outros microrganismos deterioradores (McDONALD, 1991; MUCK, 2010; DUNIÈRE, 2013).

Os fungos filamentosos são microrganismos pluricelulares, sua presença está relacionada com a má compactação da massa ensilada, matéria seca elevada e tamanho de partículas irregulares. Estes microrganismos concentram-se mais na região periférica do silo durante o desabastecimento por ser regiões mais aeradas (DUNIÈRE, 2013). Os fungos filamentosos crescem de forma mais lenta quando comparados a outros microrganismos e sua presença só ocorre após a contaminação por leveduras que consomem os ácidos orgânicos, aumentando pH e assim, tornando o ambiente favorável para o seu desenvolvimento (MUCK; SHINNERS, 2001).

Os principais gêneros identificados em silagens são de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Absidea*, *Monoascus*, *Mucor* e *Scopulariopsis* (SANTOS et al., 2002; EL-SHANAWANY et al., 2005; DRIEHUIS et al., 2018). Os fungos são microrganismos aeróbios e muitos e geralmente não toleram ambientes com baixa acidez, podendo ter seu crescimento limitado durante o período fermentativo da silagem (McDONALD, 1991), no entanto, algumas espécies são tolerantes em meios ácidos (PAULUSSEN et al., 2016). A presença destes microrganismos se torna prejudicial a qualidade da silagem devido os mesmos degradarem açúcares e ácido lático e por também hidrolisar e metabolizar a celulose e outros componentes da parede celular (DEACON, 2005). Silagens com presença de bolores facilmente se identifica algumas das principais espécies, que são do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* que se desenvolvem bem quando a silagem entra em contato com o oxigênio e a partir disso produzem algumas toxinas prejudiciais aos animais e seres humanos (BENNET; KLICH, 2003; DRIEHUIS et al., 2018).

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de fungos e são altamente tóxicas. Os principais protagonistas da produção dessas micotoxinas pertencem ao gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, entre outros (EL-SHANAWANY et al., 2005; BRAKHAGE; SCHROEKHE, 2010). A síntese de micotoxinas é estimulada em muita das vezes em condições de estresse devido as concentrações de oxigênio, temperatura, pH, atividade de água e pela influência do substrato (MUCK, 2010; REVERBERI et al., 2010). As micotoxinas não são um problema para a conservação da forragem, porém, quando consumida pelos animais podem gerar diferentes sintomas, comprometendo o sistema imunológico, desequilíbrios hormonais e aumento de infecções (MORGAVI; RILEY, 2007; MUCK, 2010).

## **2.4 Inoculantes microbianos**

Os inoculantes microbianos são comumente os aditivos mais utilizados para a confecção de silagens. Estes produtos contêm principalmente as BAL que são utilizadas para melhorar a ação da população já existente na massa que está sendo ensilada, potencializando assim, o processo fermentativo (MUCK, 2010; MUCK et al., 2018).

Os inoculantes primordialmente objetivam propiciar produção eficiente de ácidos orgânicos, acelerar o abaixamento de pH, preservar os nutrientes da forragem conservada e contribuir para a recuperação de MS por meio da inibição do desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Os inoculantes também devem possuir a capacidade de inibição de atividades relacionadas as proteases e deaminases, bem como, adicionar de forma predominante os microrganismos benéficos para o processo de fermentação (KUNG Jr et al., 2003).

O uso de inoculantes microbianos apresentam diversas vantagens, como a segurança e facilidade de manuseio, facilidade de conservação, ausência de corrosão dos maquinários e por também não ser um produto poluente ao meio ambiente (FILYA et al., 2000; ÁVILA, 2007; MUCK et al., 2018). O sucesso da utilização de inoculantes é dependente de três fatores, tais como a concentração de açúcares disponíveis na forragem, das BAL epifíticas e das espécies utilizadas no inoculante. Levando em consideração que os tipos de bactérias utilizadas nos inoculantes devem ser competitivos em relação à a diversidade de microrganismos epifíticos para que estas exerçam consideráveis efeitos no processo fermentativo (MUCK, 1993).

Alguns trabalhos demonstram que não somente as silagens melhoram a fermentação com o uso de inoculantes, mas também melhoram a produção de leite, o ganho diário ou eficiência alimentar (WIENBERG; MUCK, 1996; MUCK et al., 2018). Oliveira et al. (2017), realizou

uma meta análise com 31 estudos de vacas leiteiras em lactação que consumiram silagens inoculadas com BAL homofermentativas e heterofermentativas facultativas, resultando em aumento da produção de leite cru. Existem diversas hipóteses sobre a melhora do desempenho animal, incluindo a inibição de microrganismos deterioradores e de toxinas (ELLIS et al., 2016b) e a interação das BAL com os microrganismos do rúmen devido a microbiota ruminal possuir certa capacidade de detoxificação podendo degradar e inativar várias micotoxinas (WAMBACQ et al., 2016). Porém, essa capacidade é limitada, pois muitas micotoxinas exibem efeitos antimicrobianos que podem influenciar e alterar a microbiota, como a patulina produzida por espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoschlamys* que atua contra protozoários e bactérias gram-positivas e negativas presentes no rúmen alterando assim o metabolismo de nutrientes podendo gerar impactos na saúde e desempenho animal (TAPIA et al., 2002).

Trabalhos focados no estudo *in vitro* da produção ruminal de metano e ácidos graxos voláteis (AGV) utilizando silagens de milho e de alfafa inoculadas com *Lactobacillus plantarum*, obtiveram resultados pouco significativos em relação a mudança de concentração de perfil dos ácidos e de metano, porém, modificaram significativamente as populações microbianas do rúmen (CONTRERAS-GOVEA et al., 2013). Entretanto, pesquisadores responsáveis pela execução de experimentos distintos obtiveram resultados semelhantes para a redução na produção de metano e AGV em estudos que avaliaram a eficiência dos inoculantes e seu efeito na fermentação ruminal (CAO et al., 2010; O'BRIEN et al., 2013).

Há uma vasta gama de inoculantes disponíveis no mercado, sendo tradicionalmente utilizados os inoculantes com cepas de bactérias homofermentativas. No entanto, a espécie *Lb. plantarum* embora seja homofermentativa facultativa tem uso predominante. O uso dessa espécie está associado a eficácia de crescimento, por ser bastante tolerante ao meio ácido e pela alta produtividade de ácido láctico. No entanto, as espécies *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *E. faecium* e *L. acidophilus* que também são bactérias homofermentativas podem ser associadas a *L. plantarum* durante o processo de ensilagem (WEINBERG; MUCK, 1996). A principal função de inoculantes microbianos homofermentativos é a de garantir rapidez e eficiência na fermentação de carboidratos solúveis em ácido láctico, propiciando rápida redução de pH e contribuindo com a conservação da massa de forragem ensilada (WEINBERG et al., 1993). No entanto, estes inoculantes não são suficientemente capazes de favorecer a estabilidade aeróbia no período pós abertura das silagens, resultando em maiores perdas de MS devido as baixas concentrações de ácido láctico e de açúcares remanescentes, o que favorece o crescimento de leveduras e de outros microrganismos oportunistas (TAYLOR et al., 2002; KRISTENSEN et al., 2010; MUCK et al., 2018).

No intuito de propiciar prolongada estabilidade aeróbia para a silagem, buscou-se desenvolver inoculantes formados por bactérias heterofermentativas que contém em especial cepas da espécie *L. buchneri* (KUNG Jr, 2009), a qual teve sua eficiência comprovada por meio de diversos estudos (ÁVILA et al., 2009; TABACCO et al., 2011; BASSO et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2016; MUCK et al., 2018). O grupo das bactérias heterofermentativas além produzirem o ácido lático, produzem o ácido acético, etanol e CO<sub>2</sub>. Os ácidos orgânicos, na inibição de microrganismos agem por meio da redução do pH ou na forma dissociada, pois dessa forma conseguem entrar dentro da célula e causar desequilíbrio energético do microrganismo indesejável presente na silagem, como exemplo ácido acético e propiônico. Embora o ácido acético seja pouco eficiente na redução do pH, ele age diretamente sobre o metabolismo de leveduras e fungos filamentosos e impede o crescimento destes microrganismos, ocasionando maior tempo de estabilidade aeróbia (MOON, 1983). Perdas do teor de MS durante o processo fermentativo têm sido observadas através da utilização de inoculantes com bactérias heterofermentativas obrigatórias, no entanto, essas perdas são menores quando comparadas com as perdas que ocorrem na exposição aeróbia das silagens. Dessa forma, a mistura de inoculantes com dupla finalidade, que associa bactérias heterofermentativas obrigatórias com bactérias heterofermentativas facultativas ou homofermentativas, tem sido viabilizada com o objetivo de reduzir perdas de MS e aumento da estabilidade aeróbia através de uma eficaz acidificação da massa e inibição de microrganismos deterioradores pela presença de ácidos orgânicos fracos (ARRIOLA et al., 2011a; MUCK et al., 2018).

## **2.5 Estabilidade aeróbia em silagens**

Estabilidade aeróbia de silagens é definida como a duração de tempo, entre o início do contato da massa ensilada com o ar até o início da deterioração, seguido do aumento de produção e uso de CO<sub>2</sub>, redução na concentração de substratos prontamente utilizáveis, aumento de temperatura, pH e do número de microrganismos espoliadores. (BERNARDES; O'KIELY, 2013).

Diversos fatores estão interligados e contribuem para o grau de resistência da massa exposta ao ar, tais como: umidade da cultura; concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>; espécie forrageira; concentração de ácidos orgânicos; população de microrganismos aeróbios e temperatura ambiente. (PITT, 1990). A produção de calor em silagens em processo de deterioração é frequentemente estimada com a temperatura média acumulada diariamente acima do valor da

temperatura ambiente. Durante as décadas de 60 e 70 se intensificaram os estudos com deterioração aeróbia, a partir do surgimento de pesquisas sobre utilização de aditivos pertencentes a classe dos ácidos orgânicos (ácido acético, propiônico e ácido fórmico), em busca de conhecimento para se controlar o crescimento de leveduras e fungos (OHYAMA et al., 1975; WOOLFORD, 1975).

A proliferação de microrganismos oportunistas como as leveduras; fungos e bactérias aeróbias, ocorre na presença de O<sub>2</sub> presente na massa. Estes microrganismos deterioradores se desenvolvem a partir de substratos fornecedores de energia presente na forragem, levando ao consumo desses nutrientes, resultando em perdas no valor nutritivo da silagem e redução do consumo alimentar dos animais devido a formação de produtos, tais como ácido butírico e aminas biogênicas (LINDGREN et al., 1985).

As leveduras podem se desenvolver mesmo em baixas concentrações de O<sub>2</sub> e em condições de pH muito ácido, ocorrendo aumento de população ao longo das fases fermentativas. Quanto aos fungos filamentosos, estes podem ser considerados auxiliadores na deterioração aeróbia de silagens, devido seu crescimento suceder o crescimento de leveduras desde o desabastecimento do silo (McDONALD et al., 1991). O aparecimento desses microrganismos também pode resultar na contaminação por micotoxinas (LINDGREN et al., 2002; DRIEUHUIS et al., 2018). Outro grupo de microrganismos que também pode surgir durante o processo de deterioração são os *Clostridium* e *Bacillus*, ambas bactérias formadoras de esporos (DRIEHUIS et al., 2018).

Variações existentes de pH, contagem de microrganismos e as mudanças de peso e composição do material avaliado também podem ser usados como indicativos de deterioração aeróbia. Medidas estratégicas para redução da deterioração aeróbia consistem na aplicação de aditivos químicos ou bacterianos, sendo uma ferramenta que pode aumentar a estabilidade aeróbia (TABACCO et al., 2009). Os ácidos orgânicos tamponados podem ser utilizados como inibidores da fermentação indesejável devido atuarem sobre a membrana da célula de microrganismos deterioradores.

A entrada do ácido na célula ocorre via transporte passivo e dentro da célula o ácido é dissociado devido ao pH ser próximo da neutralidade, acarretando na liberação de íons H<sup>+</sup> reduzindo assim, o pH intracelular. Para manutenção da acidez constante, o microrganismo deve eliminar os íons H<sup>+</sup>, este processo exige uma carga energética muito alta do microrganismo que está em contato com o ácido, o que propicia retardamento de seu crescimento podendo culminar com a morte da célula (DAVIDSON, 1997).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS B. A.; JABER G. M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk of ruminants in Basrah province Iraq. **Journal of Veterinary Science**.v.26. p.47–51, 2010.
- ABEE, T., GROOT, M.N., TEMPELAARS, M., ZWIETERING, M., MOEZELAAR, R., VAN DER VOORT, M. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. **Food Microbiol**.v.28. p.199–208, 2011.
- ALLEN, M. S.; COORS, J. G.; ROTH, G. W. Corn silage. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Co-ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA, CSSA, SSSA. Cap. 12, p. 547-608. (Agronomy, 42), 2003.
- ÁVILA, C.L.S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, v.64, p.384-394, 2009.
- ÁVILA, C.L.S. **Isolamento e uso de *Lactobacillus buchneri* na ensilagem de capim-Mombaça e cana-de-açúcar**. 2007. 175f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, 2007.
- BASSO, F. C. et al. Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V.41, n.7, 2012.
- BASSO, F.C. et al. Características da fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com *Bacillus subtilis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. 13, 1009–1019, 2012.
- BENNETT, J.W. e KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, 16, 497–516, 2003.
- BERNARDES, T. F.; ADESOGAN, A. T. Aerobic deterioration of silages in warm climates. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DE PASTAGEM, 6., 2012, Viçosa, MG. **Proceedings...** Viçosa, MG: UFV: DZO, p. 249-268, 2012.
- BERNARDES, T. F.; DANIEL, J. L. P.; ADESOGAN, A. T.; McALLISTER, T. A.; DROUIN, P.; NUSSIO, L. G.; HUHTANEN, P.; TREMBLAY, G. F.; BÉLANGER, G.; CAI, Y. Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. **Journal Dairy Science**, v.101, p. 4001-4019, 2018.
- BERNARDES, T. F.; MORAIS, G.; SILVA, N. C. Alternativas de suplementação volumosa na estação seca do ano. **Agricultural report**, Belo Horizonte, v. 33, n. 266, p. 7-14, 2012.
- BERNARDES, T. F.; O'KIELY, P. Deterioração aeróbia em silagens. In: REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. (Ed.) **Forragicultura, Ciência, Tecnologia e Gestão dos Recursos Forrageiros**. Jaboticabal, SP: Maria de Lurdes Brandel., 2013. p.681-688, 2013.
- BERNARDES, T. F.; SCHMIDT, P.; DANIEL, J. L. P. An overview of silage production and utilization in Brazil. In: **Proceeding...** INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE 17, Piracicaba, Brazil. p. 124-144, 2015.

- BOLSEN, K. K. Silage: basic principles. In: BARNES, R. F.; MILLER, D. A.; NELSON, C. **J. Forages**. 5. ed. Ames: Iowa State University.p.163-176, 1995.
- BORREANI, G.; TABACCO, E. Temperature measurements of large scale silo face to assess aerobic deterioration of corn silage on farm. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2009, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba: ESALQ, 2009. p.175-187, 2009.
- BORREANI, G.; TABACCO, E.; SCHMIDT, R. J.; HOLMES, B. J.; MUCK, R. E. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silage. **Journal Dairy Science**, v.101, p.3952-3979, 2018.
- BRAKHAGE, A. A.; SCHROEKHE, V. Fungal secondary metabolites: strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 48, n. 1, p. 16-22, Jan, 2010.
- BUXTON, D. R.; O'KIELY, P. Preharvest plant factors affecting ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Co-ed.). **Silage Science and Technology**. Madison: ASA. (Agronomy, 42), Cap. 5, p. 199-250, 2003.
- CAO, Y.; TAKAHASHI, T.; HORIGUCHI, K.; YOSHIDA, N. Effect of adding lactic acid bacteria and molasses on fermentation quality and *in vitro* ruminal digestion of total mixed ration silage prepared with whole crop rice. **Grassland Science**.v.56. p.19–25, 2010.
- CERNICCHIARO, N. et al. Risk factors associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Ontario beef cow-calf operations. **Preventive Veterinary Medicine**. 92, 106–115, 2009.
- CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Reviews**, v.46, p.267-280, 1987.
- CONTRERAS-GOVEA, E.; MUCK, R. E.; G. A. BRODERICK, WEIMER, P. J. *Lactobacillus plantarum* effects on silage fermentation and *in vitro* microbial yield. **Animal Feed Science and Technology**, 179; pp. 61–68, 2013.
- DAVIDSON, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTEVILLE, T.J. (Ed) **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, p. 520-556, 1997.
- DEACON, J.W. **Fungal Biology**. Malden: Blackwell Publishing. 4. ed., p. 1-15, 2005.
- DRIEHUIS, F. Silage and the safety and quality of dairy foods: A Review. **Agriculture Food Science**, v.22, p.16-34, 2013.
- DRIEHUIS, F., J.; WILKINSON, M.; JIANG, Y.; OGUNADE, I. M.; ADESOGAN, A. T. Silage review: Animal and human health risks from silage. **Journal Dairy Science**, v.101, p.4093-4110, 2018.
- DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **Vet. Q**.v.22.p.212–216, 2000.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. 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**, Malden, v.87, p. 583-594, 1999.

DUNIÈRE, L. et al., D.; Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. **Animal Feed Science and Technology**, 182:1-15, 2013.

EL-SHANAWANY, A. A.; MOSTAFA, M. E.; BARAKAT, A Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic Aspergilli toxins. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 159, n. 2, p. 281–289, Feb, 2005.

ELLIS, J. L.; HINDRICHSEN, I. K; KLOP, G.; KINLEY, R. D.; MILORA, N.; BANNINK, A.; DIJKSTRA, J. Effects of lactic acid bacteria silage inoculation on methane emission and productivity of Holstein Friesian dairy cattle. **J. Dairy Sci.** v. 99. p. 7159–7174, 2016b

FILYA, I., G. ASHBELL, Y. HEN e Z. G. WEINBERG. The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of whole crop wheat silage. **Animal Feed Science Technology**. 88:39-46., 2000.

FLYTHE, M.D. e RUSSELL, J.B. The effect of pH and a bacteriocin (bovici HC5 on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acids in ensiled plant materials. **FEMS Microbiology Ecology**, 47. 215-222, 2004.

HASSAN, L.; MOHAMMED, H.O.; MCDONOUGH, P.L. Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**.51, 63–73, 2001.

KIATPAPAN, P.; MUROOKA, Y. Genetic manipulation system in *Propionibacterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.93, n.1, p.1-8, 2002.

KRISTENSEN, N.B.; SLOTH, K.H.; HOJBERG, O.; SPLIID, N.H.; JENSEN, C.; THOGERSEN, R. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 3764-3774, 2010.

KUNG Jr. L. Effects of microbial additives in silages: facts and perspectives. In: ZOPOLLATTO M., MURARO G.B., NUSSIO L.G. (eds) **International Symposium on Forage Quality and Conservation**. Piracicaba, Sao Paulo, Brazil: FEALQ. p. 7-22, 2009.

KUNG Jr., L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA, p.305-360, 2003.

LARA, E. C.; BASSO, F. C.; DE ASSIS, F. B.; SOUZA, F. A.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Changes in the nutritive value and aerobic stability of corn silages inoculated with *Bacillus subtilis* alone or combined with *Lactobacillus plantarum*. **Animal Production Science**, v.56, p.1867-1874, 2016.

LINDGREN, S.; OLDENBURG, E.; PAHLOW, G. Influence of microbes and their metabolites on feed and food quality. In: GENERAL MEETING OF THE EUROPEAN GRASSLAND FEDERATION, La Rochelle. **Proceedings...** p.503-511, 2002.

LINDGREN, S.; PETTERSSON, K.; KASPERSON, A.; LINGVALL, P. Microbiological Dynamics during aerobic deterioration of silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 36, p. 765-774, 1985.

MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B.; KOLSTRUP, C. Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. **Journal Dairy Science**, v.89, p.3866-3875, 2006.

MAHANNA, B. Proper management assures high-quality silage, grains. **Feedstuffs**, n.10/17, p.12-56, 1994.

MAHANNA, B.; CHASE, L. E. Practical applications and solutions to silage problems. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J.H. (Ed). **Silage Science and Technology**. p. 855–895, v. 42. Ed. American Society Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society America, 677 S. Segoe Rd., Madison, WI 53711, 2003.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcombe Publications, 340p., 1991.

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

MUCK R.E.; SHINNERS, K.J. **Conserved forage (silage and hay): progress and priorities**. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 29, 2001, São Pedro. Anais... São Pedro: SBZ. p.753-762, 2001.

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

MUCK, R. E.; NADEAU, E. M. G.; McALLISTER, T. A.; CONTRERAS-GOVEA, F. E.; SANTOS, M. C.; KUNG Jr, L. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **J. Dairy Sci**. v. 101. p. 3980–4000, 2018.

MUCK, R. E.; PITT, R.E. **Ensiling and its effect on crop quality silage**. In: SILAGE PRODUCTION FROM SEED TO ANIMAL, 67, 1993. New York. Proceedings. New York: NRAES, p.57-66, 1993.

O'BRIEN, M.; NAVARRO-VILLA, A.; PURCELL, P.; O'KIELY, P. Reducing in vitro rumen methanogenesis for two contrasting diets using a series of inclusion rates of eleven additives. **Animal Production Science**, 54, 141-157, 2013.

OGUNADE, I. M; Y. JIANG; D. H. KIM; A. A. PECH CERVANTES; K. G. ARRIOLA; D. VYAS; Z. G. WEINBERG; K. C. JEONG, AND A. T. ADESOGAN. Fate of E. coli O157:H7 and bacterial diversity in corn silage contaminated with the pathogen and treated with chemical or microbial additives. **Journal of Dairy Science**. v.100, n.3, p.1-15, 2017.

OGUNADE, I. M.; KIM, D. H.; JIANG, Y.; WEINBERG, Z. G.; JEONG, K. C.; ADESOGAN, A. T. Control of *Escherichia coli* O157:H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.4427-4436, 2016.

OHYAMA, Y.; MASAKI, S.; HARA, S. Factors influencing aerobic deterioration of silage and changes in chemical composition after opening silos. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 26, p. 1137-1147, 1975.

OLIVEIRA, A. S.; WEINBERG, Z. G.; OGUNADE, I. M.; CERVANTES, A. A. P.; ARRIOLA, K. G.; JIANG, Y.; KIM, D.; LI, X.; GONÇALVES, M. C. M.; VYAS, D.; ADESOGAN, A. T. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.4587-4603, 2017.

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

OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.A. et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.1, p.125-132, 2001.

PAHLOW, G; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy.p. 31-94, 2003.

PANG, H.; QUINB, G.; TANB, Z.; LIB, Z.; WANGB, Y.; CAI, Y. Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and *recA* gene analysis. **Systematic and Applied Microbiology**, v.34, p.235–241, 2011a.

PAULUSSEN, C.; HALLSWORTH, J.E.; ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; NIERMAN, W.C.; HAMILL, P.G.; BLAIN, D., *et al.* (in press) Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial Biotechnology**. p. 1-27, 2016

PEREIRA, O.G.; RIBEIRO, K.G.; PEREIRA, D.H. Produção e utilização de forragens conservadas. **Proceedings** in: Semana de Zootecnia, 2, Diamantina. Anais... Diamantina. MG. p. 75-118, 2004.

PITT, R.E. Silage and hay preservation. Ithaca: **Northeast Regional Agricultural Engineering Service**. p.53, 1990.

REVERBERI, M.; RICELLI, A. e ZJALIC, S. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied Microbial Biotechnology**, 87, 899–911, 2010.

SANTOS, A. O.; AVILA, C. L.; PINTO, J. C.; CARVALHO, B. F.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. *Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage*. **Journal Applied Microbiology**, v.120, 266-279, 2016.

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

SANTOS, V. M.; DORNER, J. W.; CARREIRA, F. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 156, n. 2, p. 133–138, 2002.

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

TABACCO, E., F. RIGHI, A. QUARANTELLI, AND G. BORREANI. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inoculant. **Journal Dairy Science**. p. 94:1409–1419, 2011.

TABACCO, E.; PIANO, S.; CAVALLARIN, L.; BERNARDES, T. F.; BORREANI, G. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculantes. **Journal of Applied Microbioloy**, Oxford, v.107, p.1632-1641, 2009.

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

TAYLOR, C.C. et al. The effect of treating whole-plant barley with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 85, p. 1793-1800, 2002.

TE GIFFEL, M.C.; WAGENDORP, A.; HERREWEGH, A.; DRIEHUIS, F. Bacterial spores in silage and raw milk. **Ant. Van Leeuwenhoek**.v.81. p.625–630, 2002.

TODOVORA, S; KOZHUHAROVA, L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.96, p.1151-1161, 2009.

VISSERS, M.M.M. et al. Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk. **Journal of Dairy Science**. 90, 3278–3285, 2007a.

WAMBACQ, E.; VANHOUTTE, I.; AUDENAERT, K.; DE GELDER, L.; HAESAERT, G. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: a review. **Journal Science Food Agriculture**, v.96, p. 2284-2302, 2016.

WEINBERG, Z. G.; MUCK, R. E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 53-68. 1996.

WEINBERG, Z.G.; ASHBELL, G.; HEN, Y. et al. Ensiling peas, ryegrass and wheat with additives of lactic acid bacteria (LAB) and cell wall degrading enzymes. **Grass and Forage Science**, v.48, p.70-78, 1993.

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E; WEIMER, P.J. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. **Journal Applied Microbiology**, v. 94, p. 1066-1071, 2003.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. Oxford University Press, New York, 2011.

WIEDMANN, M. ADSA Foundation Scholar Award—an integrated science-based approach to dairy food safety: *Listeria monocytogenes* as a model system. **Journal of Dairy Science**, 86, 1865–1875, 2003.

WILKINSON, J. M.; BOLSEN, K. K; LIN, C. J. History of silage. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J.H. (Ed). **Silage Science and Technology**. p. 1–30, v. 42. American Society Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society America, 677 S. Segoe Rd., Madison, WI 53711, 2003.

WOOLFORD, M. K. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 26, p. 229-237, 1975.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Malden, v. 68, p. 101-116, 1990.

**SEGUNDA PARTE**

**ARTIGO: Efeito da inoculação com *Lactobacillus farraginis* e *Lactobacillus buchneri* e do tempo de estocagem sobre as características da silagem de milho**

(Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003))

### **Efeito da inoculação com *Lactobacillus farraginis* e *Lactobacillus buchneri* e do tempo de estocagem sobre as características da silagem de milho**

**Resumo:** O milho apresenta características favoráveis para a produção de silagem de qualidade. No entanto, são comuns problemas de deterioração aeróbia na fase de abertura dos silos. O objetivo foi avaliar cepas epifíticas da planta de milho de bactérias ácido lácticas (BAL) pertencentes ao grupo *Lactobacillus buchneri*, por meio do perfil fermentativo, contagem microbiana, valor nutritivo, estabilidade aeróbia e tempo de estocagem. Os tratamentos consistiram em: i) Silagem de milho sem inoculação (CON), ii) Silagem de milho inoculada com *Lactobacillus farraginis*, iii) Silagem de milho inoculada com *Lactobacillus buchneri*. Os tempos 0, 29, 103 e 193 dias de estocagem das silagens foram avaliados quanto aos produtos finais da fermentação, contagem microbiana, valor nutritivo e estabilidade aeróbia. Os dados foram analisados usando a função *fat2.dic* do pacote *ExpDes.pt* do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2019). Dois contrastes foram testados para comparar: i) CON vs. *L. farraginis*, ii) CON vs. *L. buchneri*. Significância foi declarada com  $P < 0,05$ . Todas as silagens foram bem conservadas, com valores de pH, em geral mais baixos para as silagens CON. No entanto, as silagens inoculadas tiveram as maiores concentrações de ácido acético e 1,2-propanodiol o que comprova o estabelecimento das BAL inoculadas. Aos 29 dias, a silagem com *L. farraginis* obteve a menor população de leveduras. A população de fungos diferiu no tempo, obtendo maiores contagens com 103 dias de estocagem. As perdas de MS para os tempos de estocagem não diferiram significativamente entre os tratamentos. A estabilidade aeróbia aos 29 e 193 dias foram mais longas para a silagem inoculada com a cepa *L. farraginis*. Em sistemas produtivos que necessitam realizar a abertura dos silos com pouco tempo de estocagem a cepa epifítica de *Lactobacillus farraginis* se torna uma eficiente fonte de inoculação para aumento da estabilidade aeróbia.

**Palavras chave:** estabilidade aeróbia, bactéria ácido láctica, cepas epifíticas, inoculante microbiano, perfil fermentativo, silagem de milho.

***Lactobacillus farraginis* and *Lactobacillus buchneri* inoculation and storage time effects on the corn silage characteristics**

**Abstract:** The corn presents favorable characteristics to a high quality silage production. However, aerobic deterioration problems are ordinary at the opening silos phase. The aim of this study was to evaluate epiphytic strains of lactic acid bacteria (LAB) on corn plants belonging to the *Lactobacillus buchneri* group, using means as fermentative profile, microbial count, nutritive value, aerobic stability and storage time. The treatments were consisted of: i) Corn silage with no inoculation at all (CON) ii) Corn silage inoculated with *Lactobacillus farraginis* (application rates 8 log CFU g<sup>-1</sup>), iii) Corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* (application rate 5 log CFU g<sup>-1</sup>). Dates of 0, 29, 103, 193 of storage time were evaluated by their final fermentation products, microbial counts, nutritive value and aerobic stability. The data were analyzed using fat2.dic function of the *ExpDes.pt* package from the R statistic software (R CORE TEAM, 2019). Two contrasts were tested for comparison purposes: i) CON vs. *L. farraginis*, ii) CON vs. *L. buchneri*. Significance was declared as  $P < 0,05$ . All the silages were properly stocked, with pH values in general lower on the silages CON. However, the inoculated silages had bigger concentrations of acetic acid and 1,2-propanediol which proves the LAB inoculated establish. At the time of 29 the *L. farraginis* silage obtained the lowest yeast population. The molds population differed in time, obtaining bigger counts at the time of 103 stocking days. The DM losses during stocking times did not differ significantly between those treatments. The aerobic stability at 29 and 103 were the longest to the inoculated silage using *L. farraginis* strains. On productive systems that have a need of opening those silos with less storage time, the epiphytic *Lactobacillus farraginis* strain becomes an inoculation source to increase aerobic stability.

**Key words:** aerobic stability, epiphytic strains, fermentative profile, heterolatic fermentation, lactic acid bacteria, microbial inoculant.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de aditivos microbianos em silagens são uma das formas de reduzir as perdas fermentativas e pode permitir com que a qualidade da silagem seja elevada (WEINBERG; MUCK, 1996; KUNG Jr et al., 2003). As aplicações dessas tecnologias desempenham funções distintas, e as bactérias do ácido lático (BAL) destacam-se nos processos de seleção de microrganismos para serem utilizados como aditivos em silagens (SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2016; REIS et al., 2018; MUCK et al., 2018). Alguns inoculantes são capazes de acelerar o processo fermentativo com a elevada produção de ácido lático e rápida redução de pH, como exemplo as BAL homofermentativas. No entanto, as cepas de BAL heterofermentativas são eficientes em diminuir a deterioração aeróbia das silagens, através da produção de outros ácidos orgânicos, além do ácido lático, que possuem eficiência comprovada na inibição dos principais microrganismos deterioradores (WEINBERG; MUCK, 1996; KUNG Jr et al., 2003; OGUNADE et al., 2016; MUCK et al., 2018). Além disso, existem outras formas de inibição como a produção de bacteriocinas de algumas espécies de BAL que desempenham efeitos benéficos como probióticos (CAO et al., 2019), demonstrando outras formas de atuação por bactérias utilizadas como inoculantes.

O gênero *Lactobacillus* é dividido em quatro grupos, conhecidos como grupo *Lactobacillus buchneri*, grupo de *Lactobacillus plantarum*, grupo *Lactobacillus reuteri* e o grupo *Lactobacillus casei* (HAMMES; HERTEL, 2009). Tanto o grupo *L. buchneri* quanto o *L. reuteri* possuem espécies heterofermentativas obrigatórias, entretanto, o grupo *L. buchneri* tem sido fortemente investigado nos estudos como potencial inoculante para as silagens, em especial a de milho. Algumas espécies deste grupo têm sido avaliadas quanto a perfil de fermentação em silagens, sendo a espécie *L. buchneri* a principal estudada e menos comum espécies de *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. diolivorans*, *L. keferi* e recentemente *L. parafarraginis* (MUCK et al., 2018).

O conhecimento da espécie, no entanto, não garante que o microrganismo tenha efeito desejado e partindo disso, se torna indispensável o estudo a nível de cepas, pois cepas diferentes apresentam mecanismos de ações diferentes (ÁVILA et al., 2009; SANTOS et al., 2013; ÁVILA et al., 2014; SANTOS et al., 2016; REIS et al., 2018). O processo de seleção é longo, partindo de um número grande de isolados, com testes preliminares em laboratório, passando pela ensilagem em mini silos e posteriormente em silos maiores. Com base nisso, a busca em conhecer cepas epifíticas da planta de milho pertencente ao grupo *L. buchneri* tem sido explorada em nossas pesquisas, e com descobertas de cepas ainda não identificadas em

experimentos com silagem de planta inteira de milho, como é o caso das cepas *Lactobacillus farraginis* e *Lactobacillus buchneri*.

Portanto, a hipótese deste trabalho é que a utilização da cepa de *Lactobacillus farraginis* selecionado especificamente para o milho melhora as características microbiológicas e a estabilidade aeróbia da silagem, podendo o efeito do inoculante depender do tempo de estocagem. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil fermentativo das silagens inoculadas com as cepas *L. farraginis* e *L. buchneri*, avaliar a inibição do desenvolvimento dos microrganismos indesejáveis e a estabilidade aeróbia

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Inoculantes

As cepas utilizadas como inoculantes pertencem ao grupo *Lactobacillus buchneri*, identificadas como *Lactobacillus farraginis* (CCMA1362) e *Lactobacillus buchneri* (CCMA1366). Estas cepas foram selecionadas a partir de 88 cepas previamente isoladas da silagem de milho que foram submetidas ao processo de seleção em busca de microrganismos com as melhores características desejáveis para uso como inoculante (COSTA, 2019). As cepas que apresentaram os melhores resultados, após serem avaliadas como inoculantes em silos experimentais foram depositadas na Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola – CCMA da Universidade Federal de Lavras – UFLA. A reativação e preparo dos inoculantes foram realizados segundo a metodologia de Ávila et al. (2009). Foi realizado uma curva de crescimento para padronização do tempo de fermentação para cultivo dos microrganismos e assim determinar a taxa de aplicação. No entanto, quando esse cultivo foi repetido para aplicação a cepa *L. buchneri* cresceu mais lentamente, o que só foi diagnosticado após plaqueamento e montagem do experimento. Para a ensilagem 20 mL do inoculante foi diluído em 380 mL de água destilada e aplicada uniformemente em 20 kg de forragem, resultando em uma taxa de aplicação de 8 log UFC (Unidade formadoras de colônia) g<sup>-1</sup> para *L. farraginis* e 5 log UFC g<sup>-1</sup> para *L. buchneri*. Para o tratamento controle foi adicionada apenas água destilada (400 mL).

### 2.2 Ensilagem

Plantas de milho inteiras (híbrido RB9004 PRO Riber – KWS Sementes S.A, Brasil), com idade de 120 dias, foram colhidas e trituradas no mesmo dia, utilizando máquina colhedora de uma linha tracionada por trator (Modelo JF C120, máquinas JF, São Paulo, Brasil). As partículas colhidas apresentaram tamanho médio de 10,65 ± 3,6mm, conforme o método descrito por Heinrich e Kononoff (2002). A ensilagem foi realizada em bombonas de 30L utilizadas como silos experimentais. A compactação da massa ensilada foi realizada manualmente atingindo uma densidade média de 701 ± 21 kg de forragem fresca por m<sup>3</sup>. Os tratamentos foram preparados em triplicata para cada tempo de estocagem: 29, 103 e 193 dias, totalizando 27 silos experimentais. Amostras da planta e das silagens em todos os tempos de estocagem também foram coletadas. Os silos foram selados, pesados e mantidos em ambiente coberto protegido da luz solar e chuva.

### 2.3 Perfil fermentativo

As análises de pH, nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), ácidos orgânicos e etanol foram obtidas por meio de um extrato aquoso (9:1) com água destilada, em que 25 g de planta fresca e das silagens foram diluídas em 225 mL de água destilada e homogeneizadas em orbital shaker por 4 minutos a 220 rpm. O pH foi mensurado para cada amostra (Digimed®DM 20 Potentiometer; Digicrom Instrumentos, SP, Brasil). A determinação do  $\text{NH}_3\text{-N}$  foi realizada de acordo com a metodologia da AOAC (2006). 2 mL do extrato aquoso foi acidificado com 10 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 50% (v/v) e congelada antes da análise. Posteriormente, a determinação de álcoois e ácidos orgânicos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em que um sistema de detecção dupla foi acoplada ao aparelho (Shimadzu, Tóquio, Japão), que consiste de um detector para o índice de refração (RID 10A) e outro detector ultravioleta (UV-vis SPD-10Ai). A separação cromatográfica dos álcoois foi realizada por uma coluna de exclusão iônica da Shimadzu (Shim-pack SCR-10H, 7,9 mm x 30 cm) operada a 30 °C, e para a separação dos ácidos orgânicos a mesma coluna foi usada e operada a 50 °C. A fase móvel foi estabelecida a partir de uma solução de ácido perclórico 100 mM (pH 2,2) com vazão de 0,6 mL/min. Os álcoois foram detectados utilizando o detector de índice de refração e os ácidos orgânicos identificados por absorvância de UV de 210 nm.

### 2.4 Análises Microbiológicas

Foram realizadas contagens de leveduras, fungos filamentosos, bactérias aeróbias esporulantes (BAE) e bactérias ácido lácticas (BAL). Diluições seriadas foram preparadas a partir do extrato aquoso com água peptonada 0,1%, seguida de plaqueamento em superfície para todos os meios utilizados. Os meios Dichloran Rose Bengal chloranphenicol (DRBC; Difco, Becton Dickinson; Sparks, MD), MRS Agar (Himedia, Biosystems Comercial de Importação e Exportação e Equipamentos para Laboratório) e AN (Ágar Nutriente – Himedia) foram utilizados para contagem de leveduras e fungos filamentosos, BAL e BAE respectivamente. Leveduras e fungos filamentosos foram separadas de acordo com a morfologia da colônia. As amostras para contagem de *Bacillus* spp. foram submetidas à choque térmico em banho-maria (modelo 316, Nova Ética) a 80°C por 10 minutos com o objetivo de eliminar as células vegetativas e induzir a esporulação nos microrganismos formadores de esporos.

## 2.5 Análises químicas

Duplicatas das amostras foram levadas à estufa de ventilação forçada a 55°C por 72h para determinação da MS (AOAC, 2006) e, posteriormente moídos em moinho do tipo Willey com peneira de crivo de 1 mm para determinação da proteína bruta (PB), conforme a AOAC (2006). Para determinação dos teores de fibra em detergente neutro (FDN), as amostras foram tratadas com  $\alpha$ -amilase termoestável e adição de sulfito de sódio, de acordo proposta de Van Soest, Robertson e Lewis (1991). Os teores de amido foram avaliados conforme Hall, 2009.

## 2.6 Estabilidade aeróbia

A estabilidade aeróbia foi avaliada por meio da temperatura. No momento de abertura das silagens (29 e 193 dias) foram utilizados 15 kg de silagem, as quais foram colocadas, sem compactação em bombonas plásticas cobertas com gaze para evitar entrada de impurezas, por um período de 192 horas (8 dias). As temperaturas do ambiente de avaliação da estabilidade aeróbia nos dois tempos foram diferentes, sendo de 28,1 ( $\pm$  0,8) e 28,5 ( $\pm$  4,4) aos 29 e 193 dias de abertura respectivamente.

A temperatura da sala e das silagens foram monitoradas em intervalos constantes de 60 minutos por um sistema informatizado e eletrônico de aquisição de dados (data loggers, modelo Impac iMini, Escort Console, São Paulo, SP), o qual foi localizado no centro das silagens. Para avaliação da temperatura ambiente, dois data loggers foram alocados em diferentes posições. A estabilidade aeróbica foi definida como o número de horas que a silagem permaneceu estável antes de atingir uma temperatura de 2°C acima da temperatura ambiente (MORAN et al., 1996).

## 2.7 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3 x 4) [ 3 silagens (1 controle sem inoculante e 2 silagens inoculadas) durante quatro tempos de estocagem (0, 29, 103 e 193 dias), com três repetições]. A análise de variância foi realizada utilizando a função *fat2.dic* do pacote *ExpDes.pt* do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2019). O teste de médias de Dunnett foi utilizado com a função *pairw.anova* do pacote *asbio* no programa estatístico R, na qual os contrastes com  $P < 0,05$  foram realizados para comparação entre as silagens. Foram testados os efeitos da adição de cepas por meio dos seguintes contrastes: Silagem controle (CON) vs. Silagens inoculada (*L. farraginis*) e Silagem controle (CON) vs. Silagens inoculada (*L. buchneri*). O teste de Tukey a 5% de probabilidade

foi utilizado para as variáveis que apresentaram diferenças significativas para o tratamento ao longo do tempo. As contagens de microrganismos foram transformadas para log antes do procedimento estatístico. Os dados foram analisados utilizando o seguinte modelo:

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

Em que:

$\mu$  = média geral;

$S_i$  = efeito da silagem;

$T_j$  = efeito de tempo de estocagem;

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

$\varepsilon_{ijk}$  = erro experimental.

Para avaliar os dados de estabilidade aeróbia dos tempos 29 e 193 dias, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância e o teste de médias de Dunnett foi utilizado com  $P < 0,05$  para comparação entre as silagens. Utilizou-se o procedimento *dic* do pacote *ExpDes.pt* do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2019), de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \varepsilon_{ij}$$

Em que:

$\mu$  = média geral;

$S_i$  = efeito da silagem;

$\varepsilon_{ij}$  = erro experimental.

### 3. RESULTADOS

A concentração de MS e de amido na planta do milho, no momento do corte foi de 31,40% e 22,73%, respectivamente. A população de bactérias crescidas em meio MRS, leveduras e fungos filamentosos foi de 7,72; 5,95 e 4,60 log UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Caracterização da composição química, microbiana e física da planta inteira de milho antes de ensilar.

Variáveis	Média
MS (%)	31,40
CINZAS (%MS)	3,30
FDN (%MS)	39,42
PB (%MS)	5,82
AMIDO (%MS)	22,73
pH	5,68
NH <sub>3</sub> -N (% N total)	0,001
População (log UFC g <sup>-1</sup> )	
BAL	7,72
BAE	4,07
LEVEDURAS	5,95
FUNGOS FILAMENTOSOS	4,60
Distribuição do tamanho de partículas (%)	
> 19 mm	4,93 ± 3,9
8 - 19 mm	51,40 ± 4,50
< 8 mm	43,66 ± 5,20
Média do tamanho de partícula (mm)	10,65 ± 3,6

MS = Matéria seca; FDN = Fibra insolúvel em detergente neutro; PB = Proteína bruta; pH = potencial hidrogeniônico; NH<sub>3</sub>-N = Nitrogênio amoniacal; BAL = Bactérias ácido lácticas e bactérias aeróbias crescidas em meio MRS; BAE = Bactéria aeróbia esporulantes.

Houve efeito significativo apenas do tempo de estocagem (Tabela 2) sobre os teores de MS ( $P = 0,0065$ ), proteína bruta ( $P = 0,0030$ ) e amido ( $P = 0,0107$ ). Os teores de MS reduziram aos 29 dias de estocagem e a partir daí se estabilizou (Tabela 5). Os teores de PB foram maiores aos 193 dias em comparação com os tempos 0 e 29 dias enquanto que as maiores concentrações de amido foram observadas no tempo 0 em relação ao tempo 103 dias de estocagem (Tabela 5). Com relação aos valores de cinzas (Tabela 2), houve efeito de tempo de estocagem e de silagens inoculadas ( $P = 0,0078$ ). Dentro do tempo 103 dias de estocagem a silagem controle apresentou menores concentrações de cinzas ( $P = 0,0167$ ) quando comparada com a silagem inoculada com *L. farraginis* (Tabela 3). Para *L. buchneri* aos 193 dias a silagem controle

apresentou maiores concentrações de cinzas ( $P = 0,0060$ ). Não houve efeito de nenhum dos fatores sobre os teores de FDN com valores médios de 40,22 % (Tabela 5).

**Tabela 2.** Probabilidade dos efeitos ( $P$ ) de silagens, tempos de estocagem e interação destes fatores sobre as características de silagens de milho

Variável	$P$		
	Silagem	Tempo	Silagens vs. Tempo
Teor de MS (%)	NS	**	NS
pH	***	***	***
Cinzas	*	***	*
PB	NS	**	NS
FDN	NS	NS	NS
Amido	NS	*	NS
BAL	**	***	*
BAE	NS	***	NS
Leveduras	NS	***	NS
Fungos filamentosos	NS	***	NS
Ácido acético	***	*	NS
Ácido butírico	NS	***	NS
1,2-propanodiol	***	NS	NS
Etanol	NS	NS	NS
NH <sub>3</sub> -N	NS	***	NS
Estabilidade aeróbia 29 dias	***	-	-
Estabilidade aeróbia 193 dias	*	-	-
Perdas de MS da estocagem	NS	*	NS

NS = não significante; \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \*\*\* =  $P < 0.001$ .

Houve redução do pH para todas as silagens até 103 dias de estocagem (Tabela 3), para as silagens controle e inoculadas com as cepas *L. farraginis*, o pH estabilizou a partir desse tempo. Nas silagens com *L. buchneri* houve um pequeno aumento do pH, se igualando a estas silagens aos 29 dias de estocagem. Nos tempos 0 e 103 dias, as silagens inoculadas apresentaram maiores valores de pH em comparação ao controle, enquanto aos 193 dias, apenas as silagens com a cepa *L. farraginis* apresentou maior valor de pH e sendo semelhante aos 29 dias (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito das silagens dentro de cada tempo de estocagem sobre a composição química e população microbiana

Variável	Tratamentos	Tempo de estocagem (d) <sup>1</sup>				Média	EPM <sup>2</sup>
		0	29	103	193		
pH	Controle	5,55a	3,66b	3,43c	3,50c	4,03	0,0074
	<i>L. farraginis</i>	5,81a	3,68b	3,56c	3,60bc	4,16	
	<i>L. buchneri</i>	5,68a	3,75b	3,52c	3,52c	4,12	
Contraste valor- <i>P</i>	CON vs. <i>L. farraginis</i>	0,0007	0,8670	0,0002	0,0012		
	CON vs. <i>L. buchneri</i>	0,0244	0,2030	0,0021	0,3729		
	Média	5,68	3,70	3,50	3,54		
Cinzas	Controle	3,13b	3,52b	3,41b	4,01a	3,52	0,0372
	<i>L. farraginis</i>	3,39b	3,86ab	4,08a	3,76ab	3,77	
	<i>L. buchneri</i>	3,24b	4,01a	3,64ab	3,55ab	3,61	
Contraste valor- <i>P</i>	CON vs. <i>L. farraginis</i>	0,4390	0,1998	0,0167	0,0773		
	CON vs. <i>L. buchneri</i>	0,8390	0,0742	0,3812	0,0060		
	Média	3,25	3,80	3,71	3,77		
BAL	Controle	7,81a	5,03b	3,02bc	1,55c	4,35	0,1607
	<i>L. farraginis</i>	7,29a	7,07a	3,65b	5,24ab	5,81	
	<i>L. buchneri</i>	8,06a	7,61a	3,37b	4,12b	5,79	
Contraste valor- <i>P</i>	CON vs. <i>L. farraginis</i>	0,0552	0,0572	0,3610	0,0507		
	CON vs. <i>L. buchneri</i>	0,3797	0,0231	0,6950	0,1580		
	Média	7,72	6,57	3,35	3,64		

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras distintas na linha são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ); <sup>2</sup>EPM = Erro padrão da média; pH = Potencial hidrogeniônico; CON = Controle (silagem sem inoculação); BAL = Bactéria ácido láctica; *L. farraginis* = silagem inoculada com *Lactobacillus farraginis*; *L. buchneri* = silagem inoculada com *Lactobacillus buchneri*.

Em relação as contagens microbianas (Tabela 2), houve interação significativa das silagens *versus* tempo de estocagem para a população de BAL ( $P = 0,0212$ ). Na comparação dos contrastes, houve tendência em maior população de BAL (Tabela 3) nas silagens inoculadas com a cepa *L. farraginis* nos tempos 29 ( $P = 0,0572$ ) e 193 dias ( $P = 0,0507$ ). As silagens inoculadas com a cepa *L. buchneri* apresentou maior população de BAL que o controle apenas no tempo 29 ( $P = 0,0231$ ).

Para BAE, leveduras e fungos filamentosos (Tabela 2), houve efeito apenas do tempo de estocagem ( $P < 0,0001$ ). Os esporos de BAE (Tabela 5) foi maior no tempo 0 de estocagem

em comparação aos demais tempos (29, 103 e 193 dias). A população de leveduras (Tabela 5) reduziu ao longo do tempo de estocagem ( $P < 0,0001$ ). Quanto aos fungos (Tabela 2), as diferenças só foram observadas apenas para o tempo de estocagem ( $P < 0,0001$ ), apresentando maior contagem apenas nos tempos 0 e 103 dias (Tabela 5). Não houve diferenças significativas para os efeitos da interação silagem *versus* tempo de estocagem ( $P = 0,5679$ ) e das silagens ( $P = 0,6680$ ).

Para o ácido acético não houve interação significativa das silagens *versus* o tempo de estocagem ( $P = 0,2180$ ) (Tabela 2). Sendo que houve diferenças significativas para os efeitos silagens ( $P < 0,0001$ ) e tempo de estocagem ( $P = 0,0107$ ). Contrastando a silagem controle *versus* as silagens inoculadas com as cepas *L. farraginis* e *L. buchneri*, estas obtiveram maiores concentrações de ácido acético (Tabela 4) ( $P < 0,0001$  e  $P = 0,0105$ , respectivamente). Avaliando o tempo de estocagem, maiores concentrações de ácido acético foram observadas aos 193 dias em comparação com o tempo de estocagem de 29 dias. Para os 103 dias de estocagem as concentrações foram semelhantes aos 29 dias. As concentrações de 1,2-propanodiol foram diferentes entre as silagens, sem interação entre os fatores (Tabela 2) ( $P < 0,0001$ ). Avaliando os contrastes (Tabela 4), observou-se maiores concentrações nas silagens inoculadas com as cepas de *L. farraginis* e *L. buchneri* em relação ao controle ( $P < 0,0001$  e  $P = 0,0005$ , respectivamente). Com relação ao ácido butírico houve diferença significativa apenas para o tempo de estocagem ( $P < 0,0001$ ) em que as maiores concentrações foram aos 193 dias (Tabela 4). As concentrações de etanol não foram afetadas por nenhum dos tratamentos (Tabela 2). Os teores de  $\text{NH}_3\text{-N}$  (Tabela 2) foram afetados apenas pelo tempo de fermentação ( $P < 0,0001$ ), com aumento de 1,16 no tempo 0 de estocagem para 3,99 e 4,05 nas silagens aos 103 e 193 dias de estocagem (Tabela 5).

Para a estabilidade aeróbia (Tabela 2) houve diferenças significativas para o efeito da silagem aos 29 ( $P < 0,0001$ ) e 193 dias ( $P = 0,0248$ ) do tempo de estocagem. Nos tempos de estocagem de 29 e 193 dias (Figura 1 e 2, respectivamente) a silagem inoculada com a cepa *L. farraginis* apresentou maior tempo de estabilidade aeróbia em comparação a silagem controle ( $P < 0,0001$  e  $P = 0,0178$ , respectivamente). Para as perdas de matéria seca (Tabela 2) houve diferenças significativas para o efeito do tempo de estocagem ( $P = 0,0361$ ), apresentando maiores perdas aos 193 dias em comparação aos 29 dias de estocagem (Tabela 5). Não houve diferenças significativas para os efeitos da interação silagem *versus* tempo de estocagem ( $P = 0,7471$ ) e das silagens ( $P = 0,5716$ ).

Tabela 4. Efeito das silagens sobre o perfil fermentativo

Variáveis	Silagem	Tempo de estocagem (d) <sup>1</sup>			Média	EPM <sup>2</sup>	Contraste valor - P	
		29	103	193			CON vs. <i>L. farraginis</i>	CON vs. <i>L. buchneri</i>
Ácido acético	Controle	0,51	0,91	0,97	0,79	0,0370	<0,0001	0,0105
	<i>L. farraginis</i>	1,81	2,02	2,09	1,97			
	<i>L. buchneri</i>	1,12	0,98	1,32	1,37			
	Média	1,15b	1,30ab	1,46a				
1,2-Propanodiol	Controle	0,00	0,05	0,01	0,02	0,0239	<0,0001	0,0005
	<i>L. farraginis</i>	0,66	0,62	0,60	0,63			
	<i>L. buchneri</i>	0,17	0,05	0,42	0,27			
	Média	0,28	0,30	0,34				

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras distintas na linha são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ); <sup>2</sup>EPM = Erro padrão da média; CON = Controle (silagem sem inoculação); *L. farraginis* = silagem inoculada com *Lactobacillus farraginis*; *L. buchneri* = silagem inoculada com *Lactobacillus buchneri*.

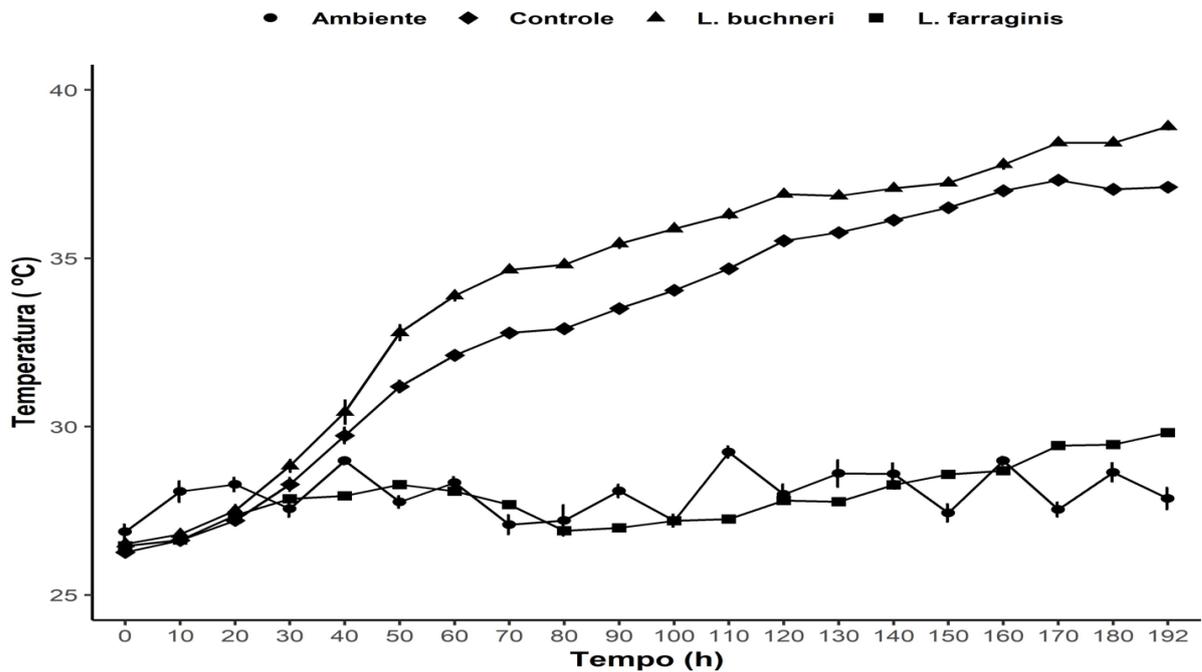
**Tabela 5.** Efeito do tempo de estocagem sobre as características das silagens

Variável	Silagem			Tempo estocagem (d) <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>
	Controle	<i>L. farraginis</i>	<i>L. buchneri</i>	0	29	103	193	
MS (%)	28,15	28,01	28,53	29,72a	27,62b	28,65ab	26,91b	0,2686
PB (%MS)	7,10	7,14	7,16	6,90b	6,98b	7,18ab	7,50a	0,0527
FDN (%MS)	40,32	40,98	39,37	39,56	40,88	39,84	40,61	0,4478
AMIDO (%MS)	22,26	21,96	22,12	22,90a	22,20ab	21,00b	22,37ab	0,1870
BAE (log UFC g <sup>-1</sup> )	3,24	3,25	3,14	4,07a	2,83b	3,00b	2,94b	0,0726
LEVEDURAS (log UFC g <sup>-1</sup> )	2,46	<2,00	2,44	5,81a	3,14b	<2,00c	<2,00c	0,1385
FUNGOS (log UFC g <sup>-1</sup> )	2,46	2,11	2,60	4,37a	<2,00b	3,73a	<2,00b	0,2234
NH <sub>3</sub> -N (% N total em %MS)	2,47	3,10	2,96	1,16c	2,15b	3,99a	4,05a	0,1092
ÁCIDO BUTÍRICO (%MS)	0,11	0,11	0,12	-	0,00b	0,05b	0,29a	0,0095
ETANOL (%MS)	1,54	1,58	1,67	-	1,68	1,56	1,55	0,0326
PERDAS MS (estocagem)	4,89	6,04	6,68	-	3,25b	6,42ab	7,94a	0,6909

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

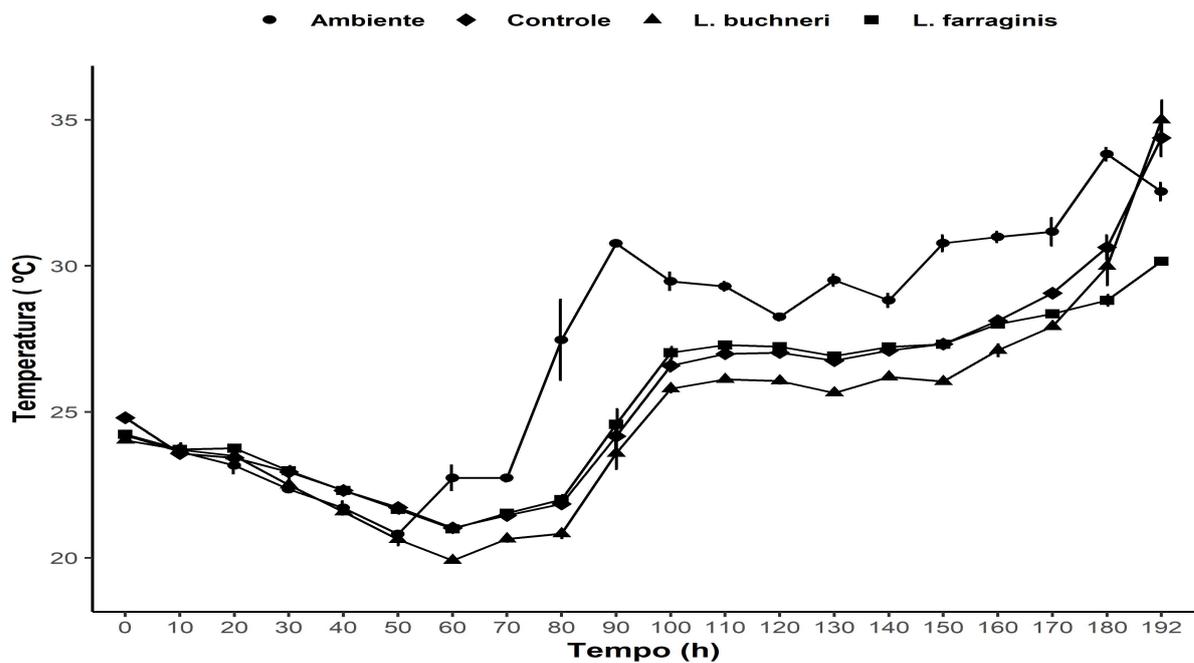
Controle = silagem sem inoculação; *L. farraginis* = silagem inoculada com *Lactobacillus farraginis*; *L. buchneri* = silagem inoculada com *Lactobacillus buchneri*; MS = Matéria seca; PB = Proteína bruta; FDN = Fibra em detergente neutro; BAE = Bactérias aeróbias esporulantes; NH<sub>3</sub>-N = nitrogênio amoniacal.

**Figura 1.** Variação da temperatura durante a estabilidade aeróbia das silagens de milho com e sem inoculação após 29 dias de estocagem.



Controle = silagem sem inoculação; *L. buchneri* = silagem inoculada com *Lactobacillus buchneri*; *L. farraginis* = silagem inoculada com *Lactobacillus farraginis*.

**Figura 2.** Variação da temperatura durante a estabilidade aeróbia das silagens de milho com e sem inoculação após 193 dias de estocagem.



Controle = silagem sem inoculação; *L. buchneri* = silagem inoculada com *Lactobacillus buchneri*; *L. farraginis* = silagem inoculada com *Lactobacillus farraginis*.

#### 4. DISCUSSÃO

O teor de MS das silagens diminuiu com o tempo da estocagem, o que pode estar relacionado com os percentuais de perdas de MS durante o período fermentativo das silagens (OLIVEIRA et al., 2017). As perdas de MS durante a estocagem podem estar associada ao intenso metabolismo das BAL heterofermentativas obrigatórias sobre o consumo de matéria orgânica do material ensilado, resultando em aumento de componentes não degradáveis como por exemplo, as concentrações de cinzas (FERRERO et al., 2019), assim como pelos processos proteolíticos vegetais e microbianos que acarretam em alterações dos compostos nitrogenados em silagens (BRÜNING et al., 2017; KUNG Jr et al., 2018a). Neste contexto, o teor de nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) durante o tempo de estocagem aumentou, permanecendo com teores semelhantes a partir dos 103 dias de estocagem e comumente isso ocorre em silagens mais úmidas (KUNG Jr et al., 2018a), como é o caso das silagens avaliadas neste estudo. Outro fator para tal resultado está associado com as quebras de subunidades de zeínas que ocorre com o tempo da estocagem, aumentando as concentrações de nitrogênio amoniacal e proteína total, como observados em outros experimentos de silagem de planta inteira de milho (DER BEDROSIAN et al., 2012; WINDLE et al., 2014; FERRARETO et al., 2015a, b; FERRARETO et al., 2016). Além disso, grupos de microrganismos, como as enterobactérias, competem com as BAL pelo mesmo substrato no início do processo de fermentação e podem degradar compostos nitrogenados para obtenção de energia (PAHLOW et al., 2003). A concentração de ácido butírico aumentou com o tempo de estocagem, o que pode evidenciar a presença de bactérias que produzem o ácido butírico, representadas principalmente pelo gênero *Clostridium*, que atuam sobre os compostos nitrogenados da silagem via liberação de enzimas proteolíticas, o que pode desencadear a liberação de amônia, gás carbônico e aminas, além de perdas de MS (SANCHES et al., 1987; KUNG et al., 2018a).

A redução do valor de pH aos 29 dias de estocagem já havia ocorrido, evidenciando a fase de fermentação ativa pela ausência de  $\text{O}_2$ , a qual apresenta variações mínimas de duração entre 7 a 45 dias (MUCK; PITT, 1993; PAHLOW et al., 2003). No entanto, pesquisas recentes indicam que a fermentação continua por muito mais tempo em silagem de planta inteira de milho em que foram submetidas a longos períodos de estocagem (DER BEDROSIAN et al., 2012; WINDLE et al., 2014). Neste estudo o pH continuou abaixando até aos 103 dias de estocagem, devido a diminuição do pH das silagens ser mais rápida em forragens com teor de MS abaixo de 30% e isso está associado com a maior quantidade de água metabólica disponível, além do baixo poder tamponante da planta de milho (KUNG et al., 2018a). BAL

heterofermentativas são menos eficientes em abaixar o pH, devido menor produção de ácido láctico, quando comparadas com BAL homofermentativas (KLEINSCHMIT; KUNG Jr, 2006a, b). Contudo, neste estudo as silagens inoculadas apresentaram valores de pH adequados, semelhantes à silagem controle. A silagem inoculada com *L. buchneri* aos 193 dias de estocagem possuía valores de pH próximo ao da silagem controle e isso pode ser pertinente ao fato de menor produção de ácido acético quando comparada com a cepa de *L. farraginis*.

A concentração de amido varia de acordo com a idade da planta e aumenta com o avançar da maturidade fisiológica (JOHNSON et al., 1999). Neste estudo o teor de MS foi baixo e era esperado baixas concentrações de amido. Além disso, houve redução de amido no tempo 103 dias o que pode está associado com a população de fungos presente neste tempo que consumiram glicose livre na massa ensilada, o que pode causar confundimento pela diminuição aparente de amido, devido a análise quantificar ao término das etapas a concentrações de glicose.

Devido as altas contagens de BAL nos tempos iniciais de estocagem, acredita-se que os teores de carboidratos solúveis em água (CSA) foram adequados para a fermentação de acordo com Piltz e Kaiser (2004). Em geral, as contagens do tempo zero foram mais altas para as BAL, chamadas de bactérias crescidas em meio MRS. Esses microrganismos podem ser assim chamados pois o meio MRS, não é totalmente seletivo e outros microrganismos podem crescer. Acredita-se que após a fermentação a maior parte dos microrganismos que crescem em meio MRS sejam BAL, porém, a identificação desses microrganismos é necessária para a confirmação da população específica de BAL, segundo Carvalho et al. (2017). Ao longo dos tempos de estocagem observa-se declínio das populações de BAL, principalmente nas silagens controle, devido não terem sido inoculadas. Todas as silagens aos 103 dias não diferem em relação a população, indicando que silagens sem inoculação possuem fermentação ativa mesmo em longos períodos de estocagem, no entanto, observa-se tendência de maior população para a cepa *L. farraginis* devido a alta taxa de inoculação. A população semelhante não quer dizer que a fermentação foi semelhante, pois BAL de diferentes espécies e até mesmo cepas com metabolismo diferentes podem estar viáveis no meio, e isso pode ser observado pelo perfil fermentativo com diferenças nos teores de ácido acético e 1,2-propanodiol. Esse comportamento de diminuição da população ao longo do tempo pode está associado também a competições pela mesma necessidade nutricional, que estrategicamente pode favorecer a liberação de bacteriocinas pelas BAL (ENNHAR et al., 2000).

Com relação as BAE, nas quais se enquadram o gênero *Bacillus*, os mesmos tiveram a população diminuída após o processo fermentativo das silagens e mantiveram-se com

contagens de no máximo 3 log UFC g<sup>-1</sup> ao longo do tempo de estocagem. Os esporos presentes não foram superiores a essa contagem devido a qualidade fermentativa das silagens estarem satisfatórias e com baixos valores de pH. Geralmente, o gênero *Bacillus* tem seu metabolismo ativo quando as silagens possuem valores de pH acima de 4,5 e com temperaturas elevadas, ocasionadas pela ação de microrganismos oportunistas (McDONALD et al., 1991; MUCK; PITT, 1994). No entanto, há relatos na literatura de contagens de BAE com 7 log UFC g<sup>-1</sup> em silagens com pH de 3,77 (DELLAGLIO, 2007; BORREANI et al., 2013), dados como esses são indicativos da sobrevivência dos esporos dos microrganismos que possuem essa capacidade esporulante presentes na silagem.

As leveduras tiveram suas populações diminuídas ao longo do tempo, devido a ação dos ácidos inibitórios de seu crescimento, em especial o ácido acético. Desde meados da década de 90, Muck (1996) sugeriu a adição de *Lactobacillus buchneri*, como aditivo em silagens devido ser uma das mais importantes espécies de BAL heterofermentativas obrigatórias com capacidade de inibir o crescimento de microrganismos deteriorados, em especial as leveduras que iniciam o processo de deterioração (ASHBELL et al., 2002; KOC et al., 2009). Contudo, em alguns estudos já realizados com algumas cepas de *Lb. buchneri*, estas não convertem o ácido láctico em ácido acético imediatamente, necessitando em torno de 30 a 60 dias para que haja essa conversão (MUCK et al., 2018). Além disso, verifica-se em alguns trabalhos que períodos de 42 a 45 dias são necessários para que haja a produção de ácido acético pelo grupo de *L. buchneri* (KLEINSCHMIT; KUNG Jr., 2006a; SCHMIDT et al., 2009; ZHOU et al., 2016). Os fungos são considerados coadjuvantes das leveduras, neste experimento tiveram contagens < 2 log UFC g<sup>-1</sup> com 29 e 193 dias, no entanto, aos 103 dias a população foi inesperadamente maior. Com isso, acredita-se que houve contaminação ambiental dos silos experimentais durante a confecção das silagens. Possivelmente algumas espécies de fungos menos tolerantes à acidez tiveram sua população diminuída aos 29 dias, e com 103 dias pode ter ocorrido adaptação de espécies mais tolerantes a acidez (PAULUSSEN et al., 2016), mas que ao longo do tempo sua população foi diminuindo pelo efeito dos ácidos na membrana da célula e tornando-a inviável (DAVIDSON, 1997).

Não foi comparado a estabilidade aeróbia nos tempos, no entanto percebe-se que numericamente a estabilidade das silagens controle e inoculada com *Lb. buchneri* aumentaram quando a silagem tinha maior tempo de estocagem. O tempo de estocagem afeta as características fermentativas de uma silagem, como população microbiana e produtos da fermentação (BORREANI et al., 2014). A cepa *L. farraginis* se destaca nos tempos 29 e 193 dias de estocagem. Esta cepa mostrou metabolismo acelerado quanto à produção de ácido

acético, atingindo 190 horas de estabilidade aeróbia aos 29 dias, indicando que tempos mais curtos de estocagem devem ser avaliados para exploração do potencial de conversão dos ácidos orgânicos dessa cepa em estudo. Silagens inoculadas com a cepa *L. buchneri* obtiveram o rompimento da estabilidade aeróbia com 34 horas de exposição, seguida de 36 horas para as silagens controle aos 29 dias, devido menor concentração de ácido acético durante o primeiro tempo de exposição. Nesse contexto, devido as maiores concentrações de ácido acético para a cepa *L. farraginis* a mesma ocasionou baixas contagens de leveduras ( $< 2 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ) no momento da abertura dos silos. A cepa *L. buchneri*, requer maior tempo para a conversão do ácido láctico à acético, conforme Muck et al. (2018). Nesse período de exposição ao ar (29 dias), possivelmente ocorreu aumento dos valores de pH nas silagens controle e inoculadas com a cepa *L. buchneri* o que pode ser atribuído ao rápido consumo de ácido láctico na presença de oxigênio. Comumente, as leveduras têm sido apontadas como microrganismos responsáveis pelo processo de deterioração em silagens, e esses microrganismos podem utilizar ácido láctico como substrato para seu crescimento (PAHLOW et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2017).

## 5. CONCLUSÃO

Todas as silagens avaliadas nesse estudo foram conservadas de maneira adequada. No entanto, dentro dos tempos de estocagem a cepa *Lactobacillus farraginis* se destacou pela produção de ácido acético e aumento da estabilidade aeróbia em curtos períodos de estocagem.

Com isso, a cepa *Lactobacillus farraginis* se torna uma alternativa viável para os sistemas produtivos que, devido questões gerenciais da fazenda necessitem realizar a abertura dos silos com pouco tempo de estocagem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESOGAN, A.T. Challenges of tropical silage production. In: BRODERICK, G.A. et al. (Ed.). In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15, 2009, Madison. **Proceedings...**Madison: University of Wisconsin, p. 139–154, 2009.
- ASHBELL, G.; WEINBERG, Z. G.; HEN, Y.; FILYA, I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **J. Ind. Microbiology Biotechnology**. v.28. p. 261–263, 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 18.ed. Gaithersburgs, MD: AOAC International, 2006.
- ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; H.; FIGUEIREDO, C. P.; SCHWAN, R. F. Effects of na indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass Forage Sci**. v. 64. p. 384–394, 2009.
- BERNARDES, T. F.; DANIEL, J. L. P.; ADESOGAN, A. T.; MCALLISTER, T. A.; DROUIN, P.; NUSSIO, L. G.; CAI, Y. Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. **Journal of Dairy Science**. v. **101**. p. 4001–4019, 2018.
- BERNARDES, T. F.; RÊGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 1852-1861, 2014.
- BORREANI, G.; TABACCO, E. Improving corn silage quality in the top layer of farm bunker silos through the use of a next-generation barrier film with high impermeability to oxygen. **J. Dairy Sci**. v. 97. p. 2415–2426, 2014.
- BRÜNING, D.; GERLACH, K.; WEIß, K.; SÜDEKUM, K.H. Effect of compaction, delayed sealing and aerobic exposure on maize silage quality and on formation of volatile organic compounds. **Grass Forage Science**, v.73, p.53-66, 2017.
- CAO, P.; WU, L.; WU, Z.; PAN, D.; ZENG, X.; GUO, Y.; LIAN, L. Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Dairy Science**, v.102. p.1-10, 2019.
- CARVALHO, B. F.; ÁVILA, C. L. S.; BERNARDES, T. F.; PEREIRA, M. N.; SANTOS, C.; SCHWAN, R. F. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **J. Appl. Microbiol**. v. 122. p. 589–600, 2017.
- COSTA, D. M. **Corn silages: Development of novel inoculant and particle size on rehydrated grain**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- DAVIDSON, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTEVILLE, T.J. (Eds) **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, p. 520-556, 1997.
- DER BEDROSIAN, M. C.; NESTOR, K. E.; KUNG Jr, L. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **J. Dairy Sci**. v. 95. p. 5115–5126, 2012.

FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. Effect of ensiling time and exogenous protease addition to whole-plant corn silage of various hybrids, maturities and chop lengths on nitrogen fractions and ruminal in vitro starch digestibility. **J. Dairy Sci.** 98:8869–8881, 2015a.

FERRARETTO, L. F.; DIAS JUNIOR, G. S.; De RESENDE, L. C.; SHAVER R. D. Effect of ensiling on kernel processing score in whole plant corn silage harvested with varied processors and settings. **J. Dairy Sci.** 98(Suppl. 2):689. (Abstr.), 2015b.

FERRARETTO, L. F.; FREDIN, S. M.; MUCK, R. E.; SHAVER, R. D. Case study: Microbial inoculant and ensiling time effects on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro and in situ starch digestibility in corn shredlage and late-maturity corn silage. **Prof. Anim. Sci.** 32:861–868, 2016.

FERRARETTO, L. F.; TAYSOM, K.; TAYSOM, D.; SHAVER, R. D.; HOFFMAN, P. C. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **J. Dairy Sci.** v. 97. p. 3221–3227, 2014.

FERRERO, F.; PRENCIPE, S.; SPADARO, D.; GULLINO, M. L.; CAVALLARIN, S.; PIANO, S.; TABACCO, E.; BORREANI, G. Increase in aflatoxins due to *Aspergillus section Flavi* multiplication during the aerobic deterioration of corn silage treated with different bacteria inocula. **Journal Dairy Science**, v.102, p.1-18, 2019.

FILYA, I.; SUCU, E. The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. **Grass Forage Sci** 65, 446–455, 2010.

HALL, M. B. Analysis of starch, including maltooligosaccharides in animal feeds: a comparison of methods and a recommended method for AOAC collaborative study. **Journal Associate off Analyze Chemical**, v.92. p.42-48-49, 2009.

HAMMES, W. P., AND C. HERTEL. Genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, 212AL. The *Firmicutes*. Pages 465–490 in **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd Ed. Vol. 3. P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. Schleifer, and W. B. Whitman, ed. Springer, New York, NY, 2009

HEINRICHS, J.; KONONOFF, P. J. Evaluating particle size of forages and TMRs using the New Penn State Forage Particle Separator. **Pennsylvania State University**, College of Agricultural Sciences, Cooperative Extension DAS 02-42, p.14, 2002.

KHAN, N. A.; YU, P.; ALI, M.; CONE, J. W.; HENDRIKS, W. H. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. **Journal Science Food Agriculture**, 95, 238–252, 2015.

KHAN, N. A.; YU, P.; ALI, M.; CONE, J. W.; HENDRIKS, W. H. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. **Journal Science Food Agriculture**, 95, 238–252, 2015.

- 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**. v. 89. p. 4005–4013, 2006b.
- KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG JUNIOR, L. The effects of *Lactobacillus buchneri*4077 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation corn silage. **J Journal of Dairy Science**. v. 89. p. 3999–4004, 2006a.
- KOC, F., L.; COSKUNTUNA, M. L.; OZDUVEN.; COSKUNTUNA, A.; SAMLI, H. E. The effects of temperature on the silage microbiology and aerobic stability of corn and vetch-grain silages. **Acta Agric. Scand.** v. 59. p. 239–246, 2009.
- KUNG Jr, L.; SHAVER, R. D.; GRANT, R. J.; SCHMIDT, R. J. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silage. **J. Dairy Sci.** v. 101. p. 4020–4033, 2018a.
- KUNG Jr, L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA, p.305-360, 2003.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcombe Publications, 340p., 1991.
- MORAN, J.P.; WEINBERG, Z.G.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; OWEN, T.R. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11., 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth: University of Wales Aberystwyth.p.162-163, 1996.
- MUCK, R. E.; PITT, R. E. Aerobic deterioration in corn silage relative to the silo face. **Transactions of the ASAE**, v.37, n.3, p.735-743, 1994.
- MUCK, R. E.; PITT, R.E. **Ensiling and its effect on crop quality silage**. In: SILAGE PRODUCTION FROM SEED TO ANIMAL, 67, 1993. New York. Proceedings. New York: NRAES, p.57-66, 1993.
- MUCK, R.E.; NADEAU, E.M. G.; McALLISTER, T.A.; CONTRERAS-GOVEA, F. E.; SANTOS, M. C.; KUNG Jr, L. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **J. Dairy Sci.** v. 101. p. 3980–4000, 2018.
- OGUNADE, I. M.; Y. JIANG; D. H. KIM; A. A. PECH CERVANTES; K. G. ARRIOLA; D. VYAS; Z. G. WEINBERG; K. C. JEONG, AND A. T. ADESOGAN. Fate of *E. coli* O157:H7 and bacterial diversity in corn silage contaminated with the pathogen and treated with chemical or microbial additives. **Journal of Dairy Science**. v.100, n.3, p.1-15, 2016.
- OLIVEIRA, A. S.; WEINBERG, Z. G.; OGUNADE, I. M.; CERVANTES, A. A. P.; ARRIOLA, K. G.; JIANG, Y.; KIM, D.; LI, X.; GONÇALVES, M. C. M.; VYAS, D.; ADESOGAN, A. T. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability,

and the performance of dairy cows. **J. Dairy Sci.** 100:4587–4603, 2017.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy.p. 31-94, 2003.

PAULUSSEN, C.; HALLSWORTH, J.E.; ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; NIERMAN, W.C.; HAMILL, P.G.; BLAIN, D., *et al.* (in press) Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial Biotechnology**. p. 1-27, 2016

PILTZ, J.W.; KAISER, A.G. Principles of silage preservation. In Successful Silage 2nd ed. KAISER, A.G.; PILTZ, J.W.; BURNS, H.M.; GRIFFITHS, N.W. pp. 25–56. **Dairy Australia and New South Wales Department of Primary Industries**, Orange, NSW, 2004.

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

REIS, C. B.; SANTOS, A. O.; CARVALHO, B. F.; SCHWAN, R. F.; ÁVILA, C. L. S. Wild *Lactobacillus hilgardii* (CCMA 0170) strain modifies the fermentation profile and aerobic stability of corn silage. **J Appl Anim**, v.46, p. 632–638, 2018.

ROSSI, F.; DELLAGLIO, F. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. **Journal of Applied Microbiology**, v.103. p.1707–1715, 2007.

SANCHEZ, R. F.; CAMERON, D. C.; COONEY, C. L. Influence of environmental factors in the production of (R)-1,2 propanediol and acetol by *Clostridium thermo saccharolyticum*. **Biotechnol. Lett.** 9:449–454, 1987.

SANTOS, A. O.; AVILA, C. L.; PINTO, J. C.; CARVALHO, B. F.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. *Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage*. **Journal Applied Microbiology**. v. 120, 266–279, 2016.

SANTOS, A. O.; AVILA, C. L.; SCHWAN, R. F. *Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage*. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.7777-7789, 2013.

SANTOS, W. P.; CARVALHO, B. F.; ÁVILA C. L. S.; DIAS JÚNIOR, G. S.; PEREIRA M. N.; SCHWAN, R. F. Glycerin as an additive for sugarcane silage. **Ann Microbiol.** v. 65. p. 1547–1556, 2014

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

SIQUEIRA, G. R; BERNARDES, T. F.; REIS, R. A. Instabilidade Aeróbia de Silagens: efeitos e possibilidades de prevenção. In: REIS, R. A.; SIQUEIRA, G. R.; BERTIPAGLIA, L.

M. A. (Ed.). **Volumosos na produção de ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep. p. 25-60, 2005.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, Oct. 1991.

WEINBERG, Z. G.; MUCK, R. E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 53-68. 1996.

WINDLE, M. C.; WALKER, N.; KUNG Jr, L. Effects of exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of times. **Journal of Dairy Science**, v. 97. p. 3053-3060, 2014.

ZHOU, Y.; DROUIN, P.; LAFRENIERE, C. Effect of temperature (5–25°C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. **Journal Applied Microbiology**, v.121, p.657-671, 2016.