



CAMILA BRANDA DOS REIS

**QUALIDADE DE SILAGENS DE MILHO (*Zea
mays* L.) E CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)
INOCULADAS COM *Lactobacillus hilgardii*
CCMA 0170**

LAVRAS - MG

2015

CAMILA BRANDA DOS REIS

**QUALIDADE DE SILAGENS DE MILHO (*Zea mays* L.) E CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) INOCULADAS COM *Lactobacillus hilgardii*
CCMA 0170**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de mestre.

Orientadora

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila

LAVRAS - MG

2015

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

Reis, Camila Branda dos.

Qualidade de silagens de milho (*Zea mays* L.) e cana-de-açúcar
(*Saccharum* spp.) inoculadas com *Lactobacillus hilgardii* CCMA
0170: / Camila Branda dos Reis. – Lavras: UFLA, 2015.
128 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientadora: Carla Luiza da Silva Ávila.

Bibliografia.

1. Inoculante. 2. *L. hilgardii*. 3. Ácido propiônico. I.

CAMILA BRANDA DOS REIS

**QUALIDADE DE SILAGENS DE MILHO (*Zea mays* L.) E CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) INOCULADAS COM *Lactobacillus hilgardii*
CCMA 0170**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2015.

Dr. Disney Ribeiro Dias UFLA

Dra. Ligiane Florentino UNIFENAS

Dr. Whasley Ferreira Duarte UFLA

Dra. Carla Luíza da Silva Ávila
Orientadora

LAVRAS – MG

2015

*Aos meus pais, Belenice e Paulo; à minha avó Irony e ao Henrique, por
acreditarem, aconselharem e tornarem possível esta conquista,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço de forma especial,

Aos meus pais, pela educação, oportunidades e palavras de conforto, nos momentos mais importantes pelos quais passei.

Ao Henrique, pelo amor, conselhos, motivação e compreensão por minha ausência em momentos importantes.

Aos meus familiares que, mesmo não presentes em todos os momentos, ajudaram nessa conquista, na torcida constante para a minha vitória.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, por me acolher e fornecer os aportes necessários ao desenvolvimento do presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela concessão da bolsa de estudos.

À doutora Carla Luiza da Silva Ávila, pela orientação, apoio e, principalmente, por acreditar e confiar em minha capacidade.

À professora doutora Rosane Freitas Schwan, pelo exemplo de profissionalismo e por acreditar na importância deste trabalho.

Ao professor Dr. Whasley Ferreira Duarte, pela ajuda nas metodologias utilizadas neste trabalho.

À Cidinha, técnica do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela preocupação e carinho nas noites que precisei passar no laboratório.

A Ivani e Juliana, técnicas do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelo carinho, amizade e ajuda instantânea nos momentos necessários.

À Rose, secretária do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela ajuda nas partes burocráticas e lembrança de datas importantes.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos fundamentais à minha formação e realização profissional.

À doutora Beatriz Carvalho, pelas explicações e ajuda na execução do meu trabalho.

À doutora Suzana Reis, pela paciência e ajuda na utilização dos cromatógrafos.

À Patrícia Krempser, pela companhia, amizade, dias e noites mais alegres e eternos e conselhos fundamentais para minhas decisões.

À Pauline Marangon, pela amizade, carinho, conselhos, momentos divertidos e inesquecíveis e companhia nas horas difíceis.

À Juliana Amorim, pelas horas me explicando metodologias e, principalmente, pela amizade imensurável, carinho, companheirismo, presença sempre constante e alegria.

À Maria Carolina Andrade, pela amizade, companheirismo, dias e noites me fazendo rir e conselhos.

À Roberta Vianna, por me acolher em sua casa em um momento difícil para ambas e, claro, pela amizade, carinho, histórias vividas e amigos conquistados.

À Andréia Santos, pela ajuda imensurável na realização do meu trabalho, paciência em me explicar técnicas e metodologias, compreensão, momentos de alegria e felicidade, conselhos e amizade.

Aos amigos do Laboratório, Nádia, Dayana, Vanessa, Luciana, Monique, Angélica, Ana Luíza, Mariana Dias, Igor e Cintia, pela ajuda e momentos alegres vividos.

A Iara, Willian, Eric, Joanne, Pâmela e Tatiane, pela enorme ajuda na abertura e montagem dos silos e nos procedimentos laboratoriais realizados.

A Fernanda, Larissa e Tatiane, pelos dias que moramos juntos e, mesmo com todas as confusões, pelo carinho e companheirismo.

Aos amigos conquistados em Lavras, Samuel, Eduardo (Japa), Eduardo (Du), Rodolfo, Rodrigo (Gonça), Fernando (Poiva), Carlos Eduardo (Cadu), Mateus (PP) e Gabriel (Biel), pelos momentos inesquecíveis de alegria e felicidade, que foram fundamentais para os meus dias.

Aos amigos de Juiz de Fora, Ana, Pablo, Tadiana, Thiago, Leandro, Polyana, Carmem, Guilherme, Karoline, Mariana, Tatiana e Jéssica, pela amizade e, principalmente, por entenderem a minha ausência em momentos especiais.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta conquista.

RESUMO

Na ensilagem, a redução do pH e a baixa concentração de oxigênio no silo colaboram para a inibição de microrganismos deterioradores e ou patogênicos e a forragem é conservada na forma de silagem. Foram conduzidos dois experimentos. O primeiro foi com o objetivo de avaliar o efeito da inoculação da cepa *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 na forragem de milho crescido em déficit hídrico. Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial tipo 2 (silagem com e sem inoculante) x 4 (tempos de abertura), com 3 repetições. A população viável de *L. hilgardii* CCMA 0170 inoculada foi de 6 log UFC g⁻¹ de forragem. Foram avaliados os teores de MS, CHO, FDN e PB; os valores de pH; as populações de BAL, leveduras e fungos filamentosos; as concentrações dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico, etanol e 1,2 propanodiol e a estabilidade aeróbica das silagens, após 90 dias de fermentação. A planta de milho apresentou teor de MS de 366,55 g⁻¹ kg MF. Os teores de PB e CHO estão dentro do recomendado (mínimo de 70 e 60 g kg⁻¹ MS, respectivamente). O teor de FDN se encontra dentro do relatado na literatura. A contagem de BAL e de fungos da microbiota epífita divergiu das encontradas na literatura. O conteúdo metabólico presente na forragem foi semelhante ao encontrado na literatura, com exceção do etanol (acima do encontrado na literatura). O teor médio de FDN, em todos os tempos de abertura, na silagem controle, foi de 594,44 g kg⁻¹ MS e, na silagem inoculada, foi de 577,78 g kg⁻¹ MS. No final da ensilagem, o teor de FDN foi de 559,92 g kg⁻¹ MS. O teor de MS atingiu 362,20 g kg⁻¹, no final da fermentação. As perdas de MS por efluente alcançaram 1,23%. O teor de CHO na silagem inoculada reduziu para 4,69 g kg⁻¹ MS e, na silagem controle, para 1,94 g kg⁻¹ MS, no final do processo fermentativo. O valor do pH atingiu 3,75 (inoculada) e 3,84 (controle), aos 90 dias de fermentação. A população de BAL nas silagens controle e inoculada atingiu 8,58 e 8,60 log UFC g⁻¹, respectivamente. As populações de leveduras e fungos filamentosos reduziram na silagem inoculada e foram menores que o mínimo detectável de 2 log UFC g⁻¹. As concentrações do ácido láctico, independente dos tempos de abertura, na silagem controle, foram de 49,33 g kg⁻¹ MS e, na silagem inoculada, de 59,85 g kg⁻¹ MS; considerando os tempos de abertura, foi de 72,46 g kg⁻¹ MS. A concentração de ácido acético atingiu 12,93 g kg⁻¹ MS, na silagem inoculada e 4,92 g kg⁻¹ MS, na silagem controle. A concentração final de etanol foi de 17,33 g kg⁻¹ MS, na silagem com inoculante e 20,36 g kg⁻¹ MS, na silagem controle. A concentração de 1,2 propanodiol, aos 90 dias de fermentação, atingiu 0,0127 g kg⁻¹, na MS. A concentração de ácido propiônico alcançou 2,79 g kg⁻¹ MS, ao final da ensilagem. O ácido butírico chegou à concentração de 1,39 g kg⁻¹ MS. As temperaturas da silagem inoculada com o *L. hilgardii* CCMA 0170 não apresentaram elevação durante todo o tempo exposto ao ar, ao contrário da

silagem controle que, com três dias de exposição, apresentou 2 °C acima da temperatura ambiente. A população média, ao final do período de exposição aeróbica, nas silagens controle e inoculada, de BAL foi de 7,18 log UFC g⁻¹ e 7,63 log UFCg⁻¹; de levedura, 5,6 log UFC g⁻¹ e 1,06 log UFC g⁻¹ e de fungos filamentosos, de 4,83 log UFC g⁻¹ e 1,12 log UFC g⁻¹, respectivamente. A inoculação do *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 melhorou a qualidade da silagem de milho com baixa umidade. O segundo experimento teve como objetivo avaliar as silagens de cana-de-açúcar inoculadas com *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170. Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial tipo 3 (doses do inoculante) x 4 (tempos de abertura), com 4 repetições. A população viável de *L. hilgardii* CCMA 0170 inoculada foi de 5 e 6 log UFC g⁻¹ de forragem. Foram avaliados os teores de MS, CHO, FDN e PB; os valores de pH; as populações de BAL, leveduras e fungos filamentosos e as concentrações de ácido láctico, acético e propiônico, etanol e 1,2 propanodiol. O teor de MS na cana-de-açúcar foi de 384,93 g kg⁻¹; de CHO, 160,82 g kg⁻¹ MS; as frações de FDN foram de 523,32 g kg⁻¹ MS; PB apresentou teor de 31,97 g kg⁻¹ MS e o pH da forragem estava em 6,32. A contagem da microbiota epífita foi de 5 log UFC g⁻¹ de BAL, 5,38 log UFC g⁻¹ de leveduras e 5,04 log UFC g⁻¹ de fungos filamentosos. Não foram encontradas concentrações de ácidos láctico, acético e propiônico, etanol e 1,2 propanodiol. O teor de CHO na silagem controle reduziu 67,06%; na silagem inoculada, com 5 log UFC g⁻¹, 63,82% e na silagem com 6 log UFC g⁻¹, 55,52%. Os valores de pH atingiram 3,56. O teor de MS na silagem controle alcançou 315,45 g kg⁻¹ MS e as silagens inoculadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹ chegaram a 378,88 e 381,56 g kg⁻¹, respectivamente. As frações de FDN na silagem controle alcançaram 713,03 g kg⁻¹ MS e, nas silagens inoculadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹, alcançaram 594,38 e 598,66 g kg⁻¹ MS. A porcentagem de perda de MS na silagem controle chegou a 29,51%; a 5 log UFC g⁻¹, 10,85% e a 6 log UFC g⁻¹, 11,31%. A silagem controle, inoculada com 5 e com 6 log UFC g⁻¹ apresentou, respectivamente, 9,16, 9,54 e 9,53 log UFC g⁻¹ de BAL. A população de leveduras na silagem controle reduziu para 4,34 log UFC g⁻¹, enquanto na silagem inoculada com 5 e 6 log UFC g⁻¹ de BAL atingiu 2,07 log UFC g⁻¹. A população de fungos filamentosos chegou a zero. A concentração de ácido láctico, independente da inoculação, chegou a 48,62 g kg⁻¹ MS. A concentração de ácido acético na silagem controle atingiu 2,89 g kg⁻¹ MS e, nas silagens inoculadas, 13,51 g kg⁻¹ MS (5 log UFC g⁻¹) e 10,53 g kg⁻¹ MS (6 log UFC g⁻¹). A silagem controle atingiu a concentração máxima de 0,44 g kg⁻¹ MS de ácido propiônico e as silagens inoculadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹ de BAL, de 1,04 e 3,15 g kg⁻¹ MS, respectivamente. O 1,2 propanodiol não foi detectado na silagem controle e nas silagens tratadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹ de BAL a concentração foi de 0,006 e 0,005 g kg⁻¹ MS, respectivamente. A concentração de etanol na silagem controle atingiu 90,02 g kg⁻¹ MS e, na silagem inoculada, 25,19 g kg⁻¹ MS (5 log UFC g⁻¹

¹) e 5,69 g kg⁻¹ MS (6 log UFC g⁻¹). A inoculação do *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 melhorou a qualidade das silagens de cana-de-açúcar, independente das doses aplicadas, principalmente pela menor concentração de etanol.

Palavras-chave: Inoculante. *L. hilgardii*. Ácido propiônico.

ABSTRACT

In silage lowering the pH and the low oxygen concentration in the silo collaborate to the inhibition of spoilage and pathogenic microorganisms and the forage is conserved as silage. Two experiments were conducted. The first one aimed to evaluate the effect of strain inoculation of *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 in corn forage that grew up in water. We used a completely randomized design with factorial arrangement type 2 (with and without silage inoculant) x 4 (opening times) with 3 repetitions. The viable population of *L. hilgardii* CCMA 0170 inoculated was 6 log CFU g⁻¹ of forage. Were evaluated levels of DM, CHO, FDN and PB, pH values, populations of BAL, yeasts and filamentous fungi, the concentrations of lactic acid, acetic, propionic and butyric acid, ethanol and 1,2 propanediol and the aerobic stability of the silage, after 90 days of fermentation. The corn plant showed DM content of 366.55 g⁻¹ kg MF. The CP and CHO levels are within the recommended (minimum of 70 and 60 g kg⁻¹ DM, respectively). The NDF is within the reported in the literature. BAL and fungal count of the epiphytic microflora are diverging from those found in the literature. The metabolic content present in the forage was similar to that found in the literature, with the exception of ethanol (above found in the literature). The average content of NDF in all opening times, the control silage was 594.44 kg⁻¹ g DM and inoculated silage was 577.78 g kg⁻¹ MS. At the end of silage NDF content was 559.92 g kg⁻¹ DM. DM content reached 362.20 g kg⁻¹ at the end of fermentation. DM losses by effluent reached 1.23%. The CHO content in the inoculated silage reduced to 4.69 g kg⁻¹ DM and in control silage to 1.94 g kg⁻¹ DM at the end of fermentation. The pH value reached 3.75 (inoculated) and 3.84 (control) after 90 days of fermentation. The BAL population in the silages inoculated control and reached 8.58 and 8.60 log CFU g⁻¹, respectively. The populations of yeasts and filamentous fungi in inoculated silage was reduced less than the minimum detectable 2 log CFU g⁻¹. The concentration of lactic acid regardless of the opening time, the control silage was 49.33 kg⁻¹ g DM and inoculated silage 59.85 g kg⁻¹ MS, considering the opening times were: 72.46 g kg⁻¹ DM. The concentration of acetic acid reached 12.93 g kg⁻¹ DM in the inoculated silage and 4.92 g kg⁻¹ DM in the control treatment. The final ethanol concentration was 17.33 g kg⁻¹ in MS silage inoculant and 20.36 g kg⁻¹ MS in the control treatment. The concentration of 1,2-propanediol after 90 days of fermentation reached 0.0127 g kg⁻¹ MS. The concentration of propionic acid alcaçou 2.79 g kg⁻¹ DM silage to the final butyric acid concentration reached 1.39 g kg⁻¹ MS. The temperature of the silage inoculated with *L. hilgardii* CCMA 0170 showed no increase air throughout the above time, unlike the control silage, which 3-day exposure showed 2 ° C above ambient temperature. The average population at the end of aerobic exposure period, the

control and inoculated silages, BAL was 7.18 log CFU⁻¹ and 7.63 g UFCG⁻¹ log CFU log yeast 5.6 g⁻¹ and 1, 06 log CFU g⁻¹ and filament fungus 4.83 log CFU g⁻¹ and 1.12 log CFU g⁻¹, respectively The inoculation of *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 improved the quality of corn silage with low humidity. The second experiment was designed to evaluate the silage cane sugar inoculated with *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170. We used a completely randomized design with factorial type 3 x 4 with four replicates. A viable population of *L. hilgardii* CCMA 0170 was inoculated 5:06 log CFU g⁻¹ of forage. Were evaluated the contents of DM, CHO, NDF, CP, also the pH values, populations of BAL, yeasts and filamentous fungi, lactic acid concentrations, acetic and propionic, ethanol and 1,2 propanediol. DM content in cane sugar was 384.93 g kg⁻¹, CHO 160.82 g kg⁻¹ DM, the NDF fractions were 523.32 g kg⁻¹ DM, CP presented content 31.97 g kg⁻¹ MS forage and the pH was 6.32. The count of the epiphytic microbiota was 5 log CFU g⁻¹ BAL, 5.38 log CFU g⁻¹ of yeast and 5.04 log CFU g⁻¹ of filamentous fungi. There were no concentrations of lactic acid, acetic acid and propionic acid, ethanol and 1,2 propanediol. The CHO n silage control content reduced 67.06% in the silage inoculated with 5 log CFU g⁻¹ 63.82% and silage with 6 log CFU g⁻¹ to CHO content 55.52%. The pH value reached 3.56. DM content in silage control reached 315.45 g kg⁻¹ DM, silage inoculated with 5:06 g⁻¹ log CFU reached 378.88 and 381.56 g kg⁻¹, respectively NDF fractions in silage control reached 713.03 g DM kg⁻¹ and silages inoculated 5 and 6 CFU log g⁻¹ and reached 594.38 598.66 kg⁻¹ MS. The percentage of dry matter loss in the control silage reached 29.51%, a 5 log CFU g⁻¹ 10.85% and 6 log CFU g⁻¹ 11.31%. The control silage, inoculated with 5 and 6 CFU g⁻¹ log presented, respectively, 9.16, 9.54 and 9.53 log CFU g⁻¹ BAL. The population of yeast in the control treatment was reduced to 4.34 log CFU g⁻¹ as silage inoculated 5- and 6-log CFU g⁻¹ BAL reached 2.07 log CFU g⁻¹. The population of filamentous fungus reached zero. The lactic acid concentration, regardless of the inoculation reached 48.62 g kg⁻¹ MS. The concentration of acetic acid in the silage controls was 2.89 g kg⁻¹ and DM silages inoculated 13.51 g kg⁻¹ MS (5 log CFU g⁻¹) and 10.53 g kg⁻¹ MS (log CFU 6 g⁻¹). The control silage reached the maximum concentration of 0.44 g kg⁻¹ DM propionic acid and the silages inoculated with 5:06 BAL log g⁻¹ CFU of 1.04 and 3.15 g kg⁻¹ DM, respectively The 1,2-propanediol was not detected in control silages and silages treated 5- and 6-log CFU g⁻¹ BAL concentration was 0.006 and 0.005 g kg⁻¹ MS, respectively The ethanol concentration reached in control silage 90.02 g kg⁻¹ DM and inoculated silagen 25.19 g kg⁻¹ MS (5 log CFU g⁻¹) and 5.69 g kg⁻¹ MS (log CFU 6 g⁻¹). The inoculation of *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 improved the quality of cane sugar silages, independent of the applied rates, mainly due to lower ethanol concentration.

Keywords: Inoculant. *L. hilgardii*. Propionic acid.

LISTA DE GRÁFICOS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Gráfico 1	Teores de fibra em detergente neutro. Figura A: Teores médios no decorrer do processo fermentativo. Figura B: Teores médios nas silagens inoculadas e controles.....	72
Gráfico 2	Teores médios de matéria seca no decorrer do processo fermentativo	73
Gráfico 3	Porcentagens médias de perda de matéria seca por efluente no decorrer do processo fermentativo.....	74
Gráfico 4	Teores de carboidratos solúveis nas silagens controle e inoculada, no decorrer do processo fermentativo.....	75
Gráfico 5	Valores de pH no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada	76
Gráfico 6	População de bactérias do ácido lático no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada.....	77
Gráfico 7	População de leveduras no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada	79
Gráfico 8	População de fungos filamentosos no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada.....	79
Gráfico 9	Concentrações de ácido lático. Figura A: Concentrações médias de ácido lático no decorrer do processo fermentativo. Figura B: Concentrações médias de ácido lático nas silagens controle e inoculada	81
Gráfico 10	Concentrações de ácido acético no decorrer do processo fermentativo nas silagens controle e inoculada.....	83
Gráfico 11	Concentrações de etanol no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada.....	84
Gráfico 12	Concentrações de 1-2 propanodiol no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada.....	85
Gráfico 13	Concentrações de ácido propiônico no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada.....	86
Gráfico 14	Concentrações de ácido butírico no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada.....	87
Gráfico 15	Variação da temperatura durante a exposição aeróbica das silagens controle e inoculada	88
Gráfico 16	População de BAL, levedura e fungos filamentosos nas silagens inoculada e controle, após sete dias de exposição ao ar.....	89

ARTIGO 2

Gráfico 1	Teores de carboidratos solúveis durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle	109
Gráfico 2	Valores médios do pH durante o processo de fermentação da silagem de cana-de-açúcar	110
Gráfico 3	Teores de matéria seca durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle	111
Gráfico 4	Teores de fibra em detergente neutro durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle	112
Gráfico 5	Porcentagem de perda de matéria seca durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle	113
Gráfico 6	População de bactérias lácticas durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle	114
Gráfico 7	População de leveduras durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle	115
Gráfico 8	População de fungos filamentosos durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle	116
Gráfico 9	Concentração de ácido láctico durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle.....	117
Gráfico 10	Concentração de ácido acético durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle	119
Gráfico 11	Concentração de ácido propiônico durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle	120
Gráfico 12	Concentração de 1,2 propanodiol durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle	120
Gráfico 13	Concentração de etanol durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle	122

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Tabela 1	Características químico-bromatológicas, microbiológicas e produção de metabólitos da planta de milho.....	70
Tabela 2	Probabilidade do efeito (<i>P</i>) dos fatores silagem e tempo de fermentação na composição das silagens de milho.....	71

ARTIGO 2

Tabela 1	Características químico-bromatológicas, microbiológicas e metabólicas da cana-de-açúcar, antes de ensilar.....	107
Tabela 2	Probabilidade do efeito (<i>P</i>) dos fatores silagem e tempo de fermentação na composição das silagens de cana-de-açúcar.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANAVA – Análise de variância
BAA – Bactéria do ácido acético
BAP – Bactéria do ácido propiônico
CHO – Carboidrato solúvel em água
CMI – Concentração mínima inibitória
CNF – Carboidrato não fibroso
CO₂– Dióxido de carbono
DIC – Delineamento inteiramente casualizado
DRBC – Dicloran rosa bengala cloranfenicol
FDA – Fibra em detergente ácido
FDN – Fibra em detergente neutro
HPLC – High performanc liquid cromathografy
Mfab – Massa fresca na abertura
MFfe – Massa fresca no fechamento
MRS – De man rogosa sharpe
MS – Matéria seca
MSab – Matéria seca na abertura
MSfe – Matéria seca no fechamento
PB – Proteína bruta
pH – Potencial hidrogniônico
PMS – Perda de matéria seca
PT – Poder tampão
PVC – Cloreto de polivivita
RPM – Rotações por minuto
SISVAR – Sistema de análise de variância
UFC – Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	18
1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Ensilagem	20
2.2	Microbiota envolvida na ensilagem	22
2.2.1	Microrganismos desejáveis	23
2.2.2	Microrganismos indesejáveis	25
2.3	Ácidos orgânicos e álcoois produzidos na ensilagem	29
2.4	Forragem e silagem	31
2.4.1	Milho	33
2.4.2	Cana-de-açúcar	36
2.5	Inoculantes microbianos	39
2.5.1	Inoculante microbiano em silagem de milho	40
2.5.2	Inoculante microbiano em silagem de cana-de-açúcar	41
2.5.3	Novas cepas bacterianas usadas como inoculante microbiológico	42
2.5.3.1	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	43
2.5.3.2	<i>Lactobacillus hilgardii</i> como inoculante microbiano	45
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	47
	REFERÊNCIAS	48
	SEGUNDA PARTE	60
	ARTIGO 1 Perfil fermentativo e estabilidade aeróbica de silagem de milho (<i>Zea mays</i> L.) crescido em déficit hídrico, inoculada com <i>Lactobacillus hilgardii</i> CCMA 0170	60
	ARTIGO 2 Efeito da inoculação de <i>Lactobacillus hilgardii</i> CCMA 0170 nas características químicas e microbiológicas da silagem de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> SPP.)	97

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Silagem é a forragem conservada por um processo de fermentação baseado na redução do pH da massa ensilada por meio, principalmente, da produção de ácido lático, acético e propiônico por bactérias lácticas. Com a redução do pH e a baixa concentração de oxigênio, a maior parte de microrganismos deterioradores é inibida e a forragem é conservada.

A qualidade da silagem de milho é influenciada por vários fatores, como o híbrido utilizado, a época da semeadura e o manejo, o solo, o clima (temperatura, precipitação pluviométrico, fotoperíodo e radiação solar), o estágio de maturação, a altura do corte da planta na colheita e as técnicas de ensilagem.

Inoculantes microbianos têm sido utilizados em ensilagens com o objetivo de melhorar sua qualidade, aumentando a população de microrganismos benéficos e, conseqüentemente, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis. Em geral, utilizam-se bactérias do ácido lático homo ou heterofermentativas. A adição de bactérias homofermentativas pode diminuir a produção de efluentes e a perda de matéria seca durante a fase aeróbica. Inoculantes contendo bactérias heterofermentativas apresentam maior eficiência no controle do crescimento de leveduras e no aumento da estabilidade aeróbia das silagens.

Estudos apontam que os resultados com a adição de inoculantes podem variar muito entre espécies de forragens ou entre condições diferentes de ensilagem. Entretanto, na maioria dos trabalhos, verificou-se a ação positiva de inoculantes sobre alguma característica da fermentação da forragem. Um dos fatores determinantes para o sucesso da aplicação de inoculantes microbianos

em forragens é a compatibilidade entre a planta e o microrganismo utilizado. Essa compatibilidade se refere a características como velocidade de crescimento do microrganismo durante a fermentação, habilidade em competir com a microbiota epífita, produção de ácido láctico e outros metabólitos, a partir dos substratos presentes na planta e sobrevivência nas condições de ensilagem.

A espécie de bactéria láctica *Lactobacillus hilgardii* é heterofermentativa obrigatória e apresenta algumas características metabólicas semelhantes às do *L. buchneri*, que é a espécie de bactéria láctica heterofermentativa obrigatória mais utilizada em inoculantes comerciais. Essas bactérias podem produzir metabólitos de interesse durante a fermentação da forragem, como ácidos láctico e acético e 1,2-propanodiol, que podem ser convertidos em ácido propiônico e 1-propanol. Estudos mostram que *L. hilgardii* pode também degradar aminas biogênicas e ácido gálico, indesejáveis em silagens. Outra propriedade dessa bactéria é sua capacidade de degradar o aminoácido arginina e produzir amônia, que pode atuar contra o crescimento de leveduras e de fungos filamentosos indesejáveis.

Ávila et al (2009b) isolaram a cepa de *L. hilgardii* CCMA 0170 e avaliaram o efeito da sua adição, em silagens de cana-de-açúcar. Os resultados foram promissores, entretanto, ainda se conhece pouco sobre o metabolismo desse microrganismo, sendo necessários estudos mais detalhados do seu efeito sobre as silagens, bem como a melhor dose de utilização e também o efeito sobre as silagens de outras plantas forrageiras, inclusive daquelas com baixo teor de umidade. Assim, o objetivo, na condução deste trabalho, foi avaliar a qualidade de silagens de milho cultivado em condições de déficit hídrico e de cana-de-açúcar inoculadas com o *L. hilgardii* CCMA 0170.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ensilagem

A ensilagem é o processo que conserva a forragem em forma de silagem, com o mínimo de perdas no seu valor nutritivo (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991). Nesse processo ocorre colheita da forragem, picagem, transporte, compactação do material, vedação adequada do silo e fermentação, na qual a combinação entre um ambiente anaeróbico e um pH baixo é de extrema importância para evitar atividade microbiana indesejada e propiciar uma silagem conservada de boa qualidade (PAHLOW et al., 2003). A picagem, o transporte, a compactação do material e a vedação adequada do silo devem ser realizados no menor tempo possível, impedindo, assim, a entrada excessiva de oxigênio no sistema (NUSSIO; CAMPOS; DIAS, 2001).

O ponto de colheita é fundamental para uma silagem de boa qualidade e está estritamente relacionado com a maturidade e a umidade da planta, e cada cultivar apresenta um ponto ótimo de colheita. O tamanho das partículas, geralmente, deve estar entre 0,5 e 2 cm, sendo essencial para que ocorra uma ótima compactação, juntamente com o teor adequado de umidade, o que favorece a rápida acidificação e a conservação da massa ensilada. A vedação rápida e adequada do silo impede a entrada de oxigênio, diminuindo o tempo de exposição do material ensilado a microrganismos deteriorados aeróbios e proporcionando a rápida queda do pH (KUNG JUNIOR; STOKES; LIN, 2003). A fermentação da ensilagem pode ser dividida nas fases aeróbica, anaeróbica, estabilidade e deterioração aeróbia (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991; NISHINO et al., 2003; OUDE ELFERINK et al., 2001b).

Quando o material é ensilado, ocorre, inicialmente, o consumo do oxigênio e de substratos presentes na forragem picada, produzindo CO₂, calor e

H₂O. Quando esta fase é prolongada, ocorre excessiva perda de matéria seca (MS), devido à utilização de carboidratos ricos em energia que podem fazer falta às bactérias do ácido lático (BAL) e/ou aos animais como fonte de energia. Ocorre, ainda, produção de calor excessivo, comprometendo a integridade e a disponibilidade das proteínas da forragem, devido à ocorrência da reação de Maillard, observada em silagens com temperatura acima de 49 °C, em que as proteínas podem reagir com os carboidratos da planta e passar a fazer parte da fibra em detergente ácido (FDA), tornando-se indigeríveis (PEREIRA et al., 2007; WEINBERG; MUCK, 1996).

Quando se esgota o oxigênio (O₂) no material ensilado, cessa a respiração celular, inibe-se o crescimento de microrganismos aeróbios deterioradores e criam-se condições favoráveis para que as bactérias lácticas epífitas e/ou inoculadas produzam ácidos orgânicos a partir dos carboidratos solúveis (CHO) da planta. Nesta fase há a formação de ácido acético, etanol, ácido lático e CO₂, decorrente da fermentação das hexoses (glicose e frutose) e pentoses (xilose e ribose). Inicialmente, o acúmulo de ácido, principalmente acético, abaixa o pH, favorecendo o surgimento de bactérias lácticas homofermentativas, mais eficientes na produção de ácido lático, que diminui o pH com mais rapidez. É normal a ocorrência de outros tipos de ácidos graxos voláteis (propiónico, butírico e lático) e isoácidos, mas a intensidade deles depende das práticas de manejo (umidade e maturidade da cultura, principalmente) e dos tipos de bactérias presentes no material (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991).

A fase estável da ensilagem ocorre após a alta taxa de crescimento das bactérias produtoras de ácido lático. Nesta fase, que se prolonga até que o silo seja aberto e a silagem tenha contato com o oxigênio, o pH ideal deve estar em torno de 3,8 a 4,2 (caso o silo tenha sido preparado corretamente), fazendo com que ocorram pequena atividade biológica e uma possível degradação da

hemicelulose, liberando pequena quantidade de açúcar. Quanto mais rápido se completar o processo fermentativo, mais nutrientes (peptídeos e aminoácidos) serão preservados, melhorando o valor nutritivo da silagem. Nas silagens de boa qualidade, o ácido láctico é o que aparece em maior proporção, normalmente 60% dos ácidos orgânicos totais, sendo praticamente inodoro, ao contrário do ácido acético, que tem cheiro de vinagre e, dependendo de sua intensidade, indica o tempo que a silagem levou para abaixar o pH (OUDE ELFERINK et al., 2001b; WOOLFORD, 1990).

A fase de deterioração aeróbia é aquela em que o oxigênio entra no silo, no momento de abertura ou por danos no sistema de vedação. A entrada de oxigênio no silo é prejudicial à qualidade da silagem, pois propicia o crescimento de leveduras, fungos filamentosos e bactérias aeróbicas que a deterioram e causam fermentação indesejada (BORREANI; TABACCO, 2010; WOOLFORD, 1990; ZHANG et al., 2009).

2.2 Microbiota envolvida na ensilagem

A microbiota na ensilagem é essencial para o sucesso da fermentação e encontra-se dividida em dois grandes grupos, de acordo com as consequências do seu crescimento durante a fermentação. Os microrganismos desejáveis são as bactérias do ácido láctico (BAL) e as bactérias do ácido propiônico (BAP). Os microrganismos indesejáveis, como leveduras, fungos filamentosos, *Enterobacteriaceae*, *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Campylobacter* e bactérias do ácido acético (BAA), são aqueles prejudiciais à conservação da forragem. Esses microrganismos apresentam baixa capacidade ou incapacidade de acidificar o meio, alto consumo de nutrientes, causam deterioração aeróbica, competem com as BAL por nutrientes, assimilam ácido láctico, reduzem o teor de MS e podem ser patogênicos e produzir toxinas, o que afeta a saúde animal

(BORREANI; TABACCO, 2010; THUAULT, 1991; WOOLFORD, 1990; ZHANG et al., 2009).

Os microrganismos presentes naturalmente nas forragens, chamados de microbiota epífita, são responsáveis, juntamente com o inoculante, pela fermentação da planta, podendo também afetar a sua estabilidade aeróbia. Essa microbiota é variável e está relacionada ao tipo de forragem, ao estágio de maturação das plantas, ao clima, ao corte, ao manejo e ao condicionamento (JUNGES, 2010). É impossível controlar a população epifítica de microrganismos presentes inicialmente na forragem picada, a não ser que seja adicionado um inoculante para que a fermentação ocorra em função de bactérias desejáveis, em detrimento de microrganismos que ocasionam fermentações indesejáveis e, conseqüentemente, perdas fermentativas e nutricionais da silagem confeccionada (TAYLOR; KUNG JÚNIOR, 2002).

2.2.1 Microrganismos desejáveis

As bactérias do ácido láctico (BAL) são bacilos gram-positivos, imóveis, não esporulantes, microaerofílicos com preferência anaeróbica e produtores de ácido láctico (HAMMES; HERTEL, 2003). Compreendem as principais bactérias que participam do processo fermentativo da forragem e os gêneros geralmente encontrados em silagens são *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (PAHLOW et al., 2003).

As BAL são classificadas, de acordo com seu metabolismo, em homofermentativas, heterofermentativas facultativas (comumente chamadas de homofermentativas) e heterofermentativas obrigatórias. As homofermentativas (*Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus ruminis*) fermentam hexoses a, quase exclusivamente, ácido láctico pela via glicolítica, devido à presença da enzima aldolase. As heterofermentativas obrigatórias (*L. brevis* e *L. buchneri*) não

possuem a aldolase e sim a fosfoquetolase. Portanto, utilizam a via das pentoses fosfato para fermentarem hexoses e pentose a ácido láctico, ácido acético e, dependendo do aceptor final, a etanol e CO₂ (AXELSSON, 2004; HAMMES; HERTEL, 2003). As heterofermentativas facultativas (*L. plantarum*, *L. pentosus* e *Enterococcus faecium*) têm as enzimas aldolase e fosfoquetolase, portanto, podem fermentar hexoses e pentoses pela via glicólica ou pentoses fosfato.

A baixa produção de etanol e o aumento da concentração de ácido acético podem ser explicados pelo fato de as heterofermentativas não possuírem a enzima acetaldeído desidrogenase, responsável pela redução de acetaldeído a etanol (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991). Mesmo o ácido acético sendo considerado pouco eficiente na redução do pH, ele apresenta ação antimicrobiana sobre leveduras e fungos filamentosos (MOON, 1983). Mesmo que o 1,2 propanodiol seja sintetizado a partir do metabolismo do ácido láctico, ele pode ser convertido a ácido propiônico e 1-propanol, por bactérias epífitas, sendo o ácido propiônico eficaz na inibição de leveduras e fungos filamentosos, tornando-o um importante elemento para aumentar a estabilidade da silagem após a abertura do silo (KLEINSCHMIT; KUNG JUNIOR, 2006).

As bactérias propiônicas fermentam açúcares e ácido láctico a ácido propiônico, acético e CO₂. O ácido propiônico é eficaz no combate a levedura e fungos filamentosos, ou seja, mostra-se como importante auxílio na estabilidade aeróbica de silagens (LINDGREN et al., 1983). Em trabalhos como o de Bolsen (1996) e Filya (2003), foi demonstrado que a inoculação de bactérias propiônicas em silagens melhorou a estabilidade aeróbica, inibindo fungos filamentosos e leveduras deterioradores.

2.2.2 Microrganismos indesejáveis

As leveduras são eucariotos, heterotróficos e anaeróbios facultativos, portanto, estão relacionadas com perdas nutricionais durante a fermentação e após a abertura do silo (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991).

Em anaerobiose, as leveduras metabolizam os carboidratos disponíveis, liberando CO₂ e etanol (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991), que diminuem a quantidade de carboidrato disponível para BAL e proporcionam efeito negativo no sabor da silagem e leite (RANDBY; SELMER-OLSEN; BAEVRE, 1999). Em aerobiose, metabolizam ácido láctico, aumentando o pH e permitindo o crescimento de outros microrganismos indesejáveis na massa ensilada (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991). Portanto, as leveduras são classificadas em grupo que utiliza ácidos orgânicos, como os gêneros *Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula* e *Pichia* e grupo que metaboliza açúcares, como o gênero *Torulopsis* (JONSSON; PAHLOW, 1984).

Os fungos filamentosos são eucariotos, quimiorganotróficos, a maioria aeróbios, mas podem ser microaerofílicos e são altamente resistentes à variação do pH (RICHARD et al., 2007). Os principais gêneros isolados em silagens são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Absidea*, *Monoascus*, *Scopulariopsis* e *Trichoderma*. A ocorrência de fungos em silagens está relacionada com a penetração de ar durante o armazenamento, principalmente por falhas como alto teor de MS e tamanho das partículas, e também na fase de abertura do silo, quando há maior difusão do oxigênio na silagem (EL-SHANAWANY; MOSTAFA; BARAKAT, 2005). Além disso, umidade elevada, substrato rico em carboidrato e temperatura, e pH adequados favorecem o crescimento de fungos filamentosos (RICHARD et al., 2007).

Além da deterioração aeróbica e das perdas nutricionais em silagens, os fungos filamentosos são produtores de micotoxinas, produtos secundários do

metabolismo que, quando ingeridas, podem acarretar danos à saúde e à produtividade animal. As micotoxinas podem ser produzidas antes da ensilagem, por fungos endofíticos ou que infectaram a forragem ainda em desenvolvimento no campo, ou após a ensilagem, devido ao manejo inadequado (RICHARD et al., 2007).

A produção de micotoxina é específica de cada fungo, requerendo condições exclusivas de umidade, temperatura, substrato e oxigênio (ECKARD et al., 2011). Os principais fungos produtores de micotoxinas encontrados em silagens são o *Fusarium* (fumosina B₁, nivalenol, desoxinivalenol, zearalenona, 15-acetil-desoxinivalenol e eniatina B e B₁), *Alternaria* (altenariol e éter monometil alternarion), *Aspergillus* (aflatoxina B₁) e *Penicillium* (andrastina A, toxina-PR, roquefortina A e C, ácido micofenólico e patulina) (MANSFIELD; JONES; KULDAU, 2008; MÜLLER; AMEND, 1997; RICHARD et al., 2007).

As enterobactérias são bacilos gram-negativos, imóveis ou móveis por flagelação peritríquia, não formadores de esporos e anaeróbios facultativos. Os principais gêneros encontrados em silagens são *Escherichia*, *Klebsiela*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Proteus* e *Enterobacter* (HENDERSON, 1993).

O desenvolvimento de enterobactérias não é desejável, pois eles competem com as BAL pelos carboidratos e produzem ácido acético, que retarda a acidificação da forragem. Além disso, degradam proteínas que, além de reduzirem o valor nutricional da silagem, liberam aminas e ácidos graxos ramificados, diminuindo a aceitabilidade da silagem pelo animal e a amônia formada aumenta a capacidade tampão, retardando o tempo de acidificação da massa ensilada. Ainda produzem óxidos nítrico e nitroso, que causam doença com sintomas semelhantes aos da pneumonia (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991). Além de afetarem a qualidade da silagem, são indesejáveis por serem patogênicas, o que pode afetar a saúde animal e a qualidade higiênica dos alimentos (WILKINSON, 1999).

A presença de enterobactérias na ensilagem pode ser minimizada por uma queda rápida no pH, entretanto, a presença de oxigênio prolonga sua sobrevivência na massa ensilada (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK, 2000).

As listérias são bacilos gram-positivos que podem formar pseudo-hifas, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos e não formadores de esporos (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK, 2000). A principal espécie encontrada é a *Listeria monocytogenes*, que apresenta alta patogenicidade e capacidade de sobrevivência (VILAR et al., 2007).

O gênero *Listeria* é indesejável, pois ele está envolvido com a deterioração aeróbica, não se desenvolvendo em silagens preparadas adequadamente. As listérias são sensíveis à combinação da anaerobiose e pH ácido, entretanto, podem sobreviver em valores de pH de 3,8 a 4,2 por longos períodos, se o oxigênio estiver presente (OUDE ELFERINK et al., 2001a).

Em trabalhos como os de Konosonoka et al. (2012), Taşçi, Türütoğlu e Ögütçü, (2009) e Vilar et al. (2007), foi detectada a presença de *Listeria* spp em silagens e nos estudos feitos por Bemrah et al. (1998) e Taşçi, Türütoğlu e Ögütçü, (2009) foram encontradas *Listeria* spp. em amostras de leite obtidas de animais que se alimentaram de silagens contaminadas.

O gênero *Clostridium* é formado por bactérias gram-positivas estritamente anaeróbicas e produtoras de endósporos, o que as torna inapropriadas nos sistemas de conservação alimentar (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002), pois são altamente resistentes a oxigênio, calor, ácidos orgânicos, radiação e enzimas (PAHLOW et al., 2003).

Os clostrídios, geralmente, crescem em silagens que apresentam acidificação lenta, devido à alta umidade, à baixa concentração de açúcares fermentescíveis e à alta concentração de nitrogênio na forragem (PAHLOW et al., 2003; SPOELSTRA, 1983). No entanto, em silagens com pH reduzido e com concentrações de MS superiores a 30%, geralmente, não se verifica a incidência

de clostrídios, sendo restritos a áreas com possíveis deteriorações aeróbicas (JONSSON, 1991).

As principais espécies já encontradas em silagens foram *C. beijerinckii*, *C. baratii*, *C. saccharolyticum*, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* e *C. perfringens* (ROSSI; DELLAGLIO, 2007).

Clostridium spp. são indesejáveis pois metabolizam carboidratos, aminoácidos e ácido láctico, produzindo ácido butírico e aminas biogênicas o que, além de reduzir a palatabilidade e a estabilidade aeróbica da silagem, resulta em perdas significativas de MS (MAHANNA, 1994). Além disso, estão associados à qualidade do leite, pois os esporos resistentes podem sobreviver no trato digestivo da vaca e ser transferidos para o leite. Caso o leite seja destinado à produção de queijo, os esporos conseguem sobreviver ao processamento e ao armazenamento, representando um problema na comercialização, devido à produção de gás e de ácido butírico, que alteram a textura e o odor do produto (DEMARQUILLY, 1998; DRIEHUIS; TE GIFFEL, 2005; OUDE ELFERINK et al., 2001a).

O gênero *Bacillus* é formado por bastonetes gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e produtores de endósporo que, assim como *Clostridium*, são inapropriados em sistemas de conservação alimentar devido à sua alta resistência (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002). As principais espécies já registradas em silagens são *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis* e *B. polymyxa* (GIFFEL et al., 2002).

Os bacilos são indesejáveis, pois, além de competirem com BAL por substratos e estarem envolvidos na deterioração da silagem, a maioria das espécies é capaz de fermentar carboidratos a ácidos orgânicos, etanol, 2-3-butanodiol e glicerol, compostos que não apresentam efeito preservativo para a silagem (GIFFEL et al., 2002). Além disso, os esporos de bacilos, assim como os de clostrídios, sobrevivem no trato digestivo de vacas, podendo ser

transferidos para o leite, acarretando problemas de saúde animal e/ou humana (PAHLOW et al., 2003).

As bactérias acéticas compreendem um grupo de bastonetes gram-negativos, aeróbios e com motilidade positiva. As principais espécies encontradas em silagens pertencem ao gênero *Acetobacter* (YAMADA; YUKPHAN, 2008).

As BAA estão envolvidas com a deterioração aeróbica da silagem. Além disso, oxidam etanol a ácido acético, sendo algumas espécies capazes de metabolizar ácidos acético e láctico a CO₂ e H₂O, ocasionando uma queda lenta do pH. Contudo, a presença de bactérias acéticas pode ter efeito benéfico na silagem, já que o ácido acético produzido é inibidor de leveduras e fungos filamentosos, e o catabolismo do excesso de etanol pode aumentar a palatabilidade da silagem (NISHINO, 2011).

2.3 Ácidos orgânicos e álcoois produzidos na ensilagem

Ácidos orgânicos, como o láctico, acético, butírico, propiônico, isobutírico, valérico, isovalérico, succínico e fórmico, e álcoois, como etanol e 1-2 propanodiol, são produzidos durante a ensilagem. Contudo, para avaliar a qualidade do processo fermentativo e, consecutivamente, da silagem, os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico e os álcoois etanol e 1-2 propanodiol são mais comumente estudados. A quantidade de ácido necessária para reduzir rapidamente o pH e inibir os processos que promovem a deterioração do material ensilado altera-se com a capacidade tampão da forrageira e com o conteúdo de umidade da silagem (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991).

A grandeza pKa é referente a um número tabelado que permite, por meio da constante de acidez (Ka), definir um ácido como forte ou fraco

(MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991). Os ácidos orgânicos entram na célula do microrganismo indesejável não tolerante por transporte passivo, devido ao fato de o meio estar mais concentrado que o ambiente intracelular. A célula com pH neutro, em torno de 7,0, possibilita a dissociação dos ácidos. Essa dissociação depende do valor de pKa dos ácidos; ácidos mais fortes têm pKa menor e se dissociam mais que ácidos fracos. Para manter a neutralidade, a célula elimina os prótons de hidrogênio por transporte passivo, o que aumenta o gasto energético e, conseqüentemente, prejudica o crescimento e a multiplicação celular (LAMBERT; STRATFORD, 1999).

Apesar de todos os ácidos formados na fermentação contribuírem para a redução do pH da silagem, o ácido láctico tem fundamental papel nesse processo por apresentar menor pKa (3,85) e, conseqüentemente, maior dissociação que os demais (MOISIO; HEIKONEN, 1994).

O conteúdo de ácido acético faz o pH decair de forma mais lenta, devido ao seu valor de pKa maior (4,75). A concentração de ácido acético está relacionada, principalmente, à ação prolongada de enterobactérias, bactérias lácticas heterofermentativas e, em menor proporção, por clostrídios. Como esse ácido orgânico afeta negativamente a queda do pH, as fermentações promovidas por microrganismos que produzem essa substância acarretam maiores perdas de matéria seca e energia do material ensilado (MUCK; BOLSEN, 1991). Contudo, as silagens bem conservadas devem apresentar reduzido conteúdo de ácido acético, já que ele pode inibir o crescimento de leveduras e fungos filamentosos e melhorar a estabilidade aeróbica das silagens (OUDE ELFERINK et al., 2001b).

O ácido propiônico está relacionado ao menor decaimento do pH, possuindo pKa 4,87. Contudo, ele está associado à ação de microrganismos que convertem o 1-2 propanodiol produzido por heterofermentadores e bactérias acéticas ou aqueles que convertem o ácido láctico ao ácido propiônico. Mesmo

que a produção de ácido propiônico possa ser a partir de ácido láctico, tal redução é benéfica, visto que o ácido propiônico apresenta efeito inibitório contra fungos filamentosos e leveduras (KLEINSCHMIT; KUNG JUNIOR, 2006).

O etanol pode sugerir alta fermentação alcoólica por leveduras e também atividade de bactérias heteroláticas, sendo um metabólito que diminui a palatabilidade da silagem (PEDROSO et al., 2011; SCHMIDT et al., 2014).

O ácido butírico reflete a extensão da atividade clostridiana sobre a forragem ensilada. O conteúdo desse ácido pode ser considerado um dos principais indicadores negativos da qualidade do processo fermentativo, além de indicar silagens que apresentaram perdas acentuadas de matéria seca, energia e redução da palatabilidade e consumo da forragem (MAHANNA, 1994).

2.4 Forragem e silagem

A preocupação em produzir alimento volumoso para os rebanhos, principalmente no período seco do ano, quando as pastagens naturais estão secas, tem aumentado a utilização da silagem (ZOPOLLATTO et al., 2009).

A qualidade da silagem está relacionada, além das técnicas adequadas de ensilagem e a microbiota envolvida na fermentação, com o teor de MS, proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), FDA, CHO e poder tampão (PT) da forragem (DAWSON et al., 1999; MCENIRY et al., 2008), que garantem um ótimo substrato para que ocorra uma fermentação adequada pelos microrganismos desejáveis. As forragens podem ser ensiladas sozinhas ou combinadas e seu valor nutritivo vai depender, principalmente, de qual forragem está sendo utilizada (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991).

A MS é a porção em que estão todos os nutrientes da planta, descontando-se a umidade, devendo seu teor estar entre 30% e 35%. Assim, a forragem terá menos perdas nutricionais no armazenamento, principalmente pelo

teor de umidade, temperatura e compactação adequadas, que reduzem os efluentes e a taxa de contaminação. Dessa forma, a silagem terá teores adequados de nutrientes, concentrações menores de ácidos durante a fermentação e melhor palatabilidade, o que aumenta o consumo voluntário, a digestibilidade das fibras e a produção de leite (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991).

Os carboidratos totais incluem o FDN e os carboidratos não fibrosos (CNF) ou CHO, correspondendo à maior energia do alimento. Os teores de CHO devem estar acima 6% na forragem (KUNG JUNIOR; STOKES; LIN, 2003). Relacionado aos CHO está o poder tampão da forragem, que é a quantidade de ácido necessária para reduzir o seu pH, ou seja, quanto maior o PT de uma forragem, mais lenta a redução do pH e maior o consumo de carboidratos da forragem (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991).

Proteínas brutas são as proteínas verdadeiras e deve apresentar-se no teor mínimo de 7%, que é o limite aceito e necessário para o crescimento e a fermentação microbiana (VELHO et al., 2007).

A FDN é a parede celular insolúvel em detergente neutro, ou seja, a quantidade total de fibra, formada pela celulose, hemicelulose e lignina (SILVA; QUEIROZ, 2002). A fibra total é negativamente relacionada ao consumo de MS, pois é fermentada lentamente e permanece por períodos longos no rúmen. Portanto, quanto menor o nível de FDN, maior o consumo de MS, sendo que, para uma silagem de qualidade, o teor de FDN deve ser menor que 50% na forragem (SOEST, 1994).

A FDA representa a fração insolúvel em detergente ácido, ou seja, a lignina e a celulose, que é a fibra indigerível. Dessa forma, indica o valor energético da silagem. Quanto menor o teor de FDA, maior o valor energético (porções digeríveis) e quanto maior o teor de FDA, menor a qualidade e a digestibilidade da silagem (CRUZ et al., 2005). A forragem deve apresentar

teores de FDA inferiores a 30% (FANCELLI et al., 2003; PIONEER SEMENTES, 1993).

2.4.1 Milho

O milho (*Zea mays* L.) é a cultura mais utilizada na produção de silagem no Brasil, devido ao baixo custo de produção, à excelente qualidade de fermentação e, conseqüentemente, à boa aceitabilidade por parte dos animais (BERNARDES, 2006). A excelente qualidade da fermentação microbiana é proporcionada pelo teor de MS, CHO e poder tampão adequados, que conservam o valor nutritivo da massa ensilada (NEUMANN et al., 2007).

Contudo, a qualidade da silagem de milho sofre influência do híbrido utilizado, da época da sementeira e do manejo, do solo, além de clima (temperatura, precipitação pluviométrico, fotoperíodo e a radiação solar), estágio de maturação, altura do corte da planta na colheita e estabilidade aeróbica (CRUZ et al., 2006; NEUMANN et al., 2007).

A época de sementeira mais adequada é aquela em que o período de floração coincide com os dias mais longos do ano e a etapa de enchimento de grãos com o período de temperaturas mais elevadas e alta disponibilidade de radiação solar. Nas condições tropicais, a distribuição de chuvas, geralmente, determina a melhor época de sementeira, pois nas regiões tropicais há menor variação da temperatura e do comprimento do dia. No sul do Brasil, o milho é plantado, geralmente, de agosto a setembro e, à medida que se caminha para os estados do centro-oeste e do sudeste, a época de sementeira varia de outubro a novembro.

A época de sementeira afeta várias características da planta, ocorrendo um decréscimo no número de espigas por planta e no rendimento de grãos, e as perdas podem ser superiores a 60 kg/ha/dia. Quanto mais tarde for o plantio,

menor será o potencial e maior o risco de perdas por seca e/ou geadas. com as condições climáticas resultantes da época de plantio (CRUZ et al., 2006).

A temperatura ideal para o desenvolvimento do milho está compreendida entre 24 °C e 30 °C, sendo a maior produção de matéria seca e o maior rendimento de grãos na temperatura observados a 21 °C. A queda do rendimento sob temperaturas elevadas se deve ao curto período de tempo de enchimento de grãos, em virtude da diminuição do ciclo da planta. A planta de milho precisa acumular unidades calóricas necessárias a cada etapa de crescimento e desenvolvimento. As cultivares normais apresentam exigências térmicas correspondentes a 890-1.200 graus-dias (G.D.); as precoces, de 831 a 890, e as superprecoces, de 780 a 830 G.D. Essas exigências calóricas se referem ao cumprimento das fases fenológicas compreendidas entre a emergência e o início da polinização (CRUZ et al., 2006).

O milho consome cerca de 600 mm de água durante seu ciclo, mas, se a temperatura estiver muito elevada e a umidade do ar muito baixa, o consumo aumenta, podendo chegar até 10 mm/dia. A ocorrência de déficit hídrico na cultura do milho pode ocasionar danos em todas as fases. No crescimento vegetativo há uma diminuição da taxa fotossintética e, com isso, a produção de grãos é afetada diretamente, pois a menor massa vegetativa tem menor capacidade fotossintética. Na fase do florescimento, há a ocorrência de dessecação dos estilos-estigmas, aborto dos sacos embrionários, distúrbios na meiose, aborto das espiguetas e morte dos grãos de pólen. Déficit hídrico na fase de enchimento de grãos reduz a taxa fotossintética e, conseqüentemente, a produção de fotossimilados e sua translocação para os grãos (CRUZ et al., 2006).

O fotoperíodo é representado pelo número de horas de luz solar e é um fator climático de variação sazonal. O milho é considerado uma planta de dias curtos. Um aumento do fotoperíodo faz com que a duração da etapa vegetativa

aumente e proporcione também um incremento no número total de folhas produzidas pela planta. Contudo, nas condições brasileiras, o efeito do fotoperíodo na produtividade do milho é praticamente insignificante (CRUZ et al., 2006).

A ausência de radiação pode inibir o processo fotossintético. Grande parte da matéria seca do milho (90%) provém da fixação de CO₂ pelo processo fotossintético. O milho é uma planta altamente eficiente na utilização da luz e uma redução de 30% a 40% da intensidade luminosa, por períodos longos, atrasa a maturação dos grãos ou pode ocasionar até mesmo queda na produção (CRUZ et al., 2006).

O estágio de maturação do milho é observado visualizando-se a posição da linha do leite no grão, que é uma camada visível limite entre a matriz sólida (acima da linha e farinácea devido ao acúmulo de amido) e a líquida (acúmulo de açúcares), que muda de posição no sentido da coroa para a base, onde o grão se insere na espiga. Quando a linha do leite se encontra entre 1/3 a 2/3, a planta já acumulou MS e amido suficiente para ser ensilada (AFUAKWA; CROOKSTON, 1984).

Em relação à altura do corte da planta é encontrada grande divergência na literatura. Nussio, Campos e Dias (2001), Nussio e Manzano (1999) e Rentero (1998), consideram que o corte elevado da planta, ou seja, maior fração de grão ensilado, mesmo diminuindo o teor de MS, melhora a resposta animal, tanto na produção de leite quanto de carne, devido ao fato de os grãos apresentarem maior teor de carboidratos (alto valor energético) e, segundo Restle et al. (2002), menores teores fibrosos (indigeríveis). Allen, Oba e Choi (1997) e Philippeau e Michalet-Doreau (1998) consideraram que o grão não está relacionado à qualidade da silagem, pois não está ligado à digestibilidade. Os principais constituintes da silagem de milho são CNF e FDN, sendo que o amido representa cerca de 70% da fração grão e a FDN, 50% da fração caule. Dessa

forma, qualquer alteração nessas duas frações representa modificações significativas na qualidade nutricional da silagem (VASCONCELOS, 2004).

A estabilidade aeróbia das silagens é determinada pelas alterações microbiológicas, químicas e físicas que ocorrem após a abertura, e a silagem de milho, por ser de alta qualidade, apresenta maior instabilidade aeróbica. Ou seja, os parâmetros que mais afetam a estabilidade aeróbica, como temperatura, concentração de carboidratos solúveis e de ácidos orgânicos, são ideais, propiciando o aumento da população de fungos, que utilizam como substrato o ácido láctico, o etanol e os açúcares solúveis, resultando em elevação do pH e redução na digestibilidade e no conteúdo energético da silagem (BASSO et al., 2012; MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991).

Tentando aumentar o período de estabilidade pós-abertura, muitos pesquisadores têm estudado os efeitos de inoculantes microbianos em silagens. Os resultados encontrados são diversificados, como os de Taylor e Kung Junior (2002), que observaram resultado positivo e os de Weinberg e Muck (1996), que encontraram resultados negativos. Portanto, estes diferentes resultados encontrados na literatura sugerem a necessidade de mais estudos com cepas microbianas que apresentem a capacidade de aumentar a estabilidade aeróbica da silagem (BASSO et al., 2012; GIMENES et al., 2006).

2.4.2 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) apresenta os parâmetros adequados para a confecção de uma boa silagem, que são alta concentração de CHO, teor de MS variando até 35% e baixo poder tampão (ZOPOLLATTO et al., 2009). Contudo, a qualidade da silagem de cana-de-açúcar sofre influência do híbrido utilizado, da época da semeadura e manejo, do solo, do clima (temperatura, umidade e luz) e da disposição dos nutrientes.

A cana-de-açúcar pode ser plantada em qualquer época do ano, desde que as condições de temperatura e a disponibilidade de água sejam favoráveis para seu nascimento e desenvolvimento. Entretanto, duas épocas são preferenciais: durante a época chuvosa, quando é verão na região centro-sul e inverno no nordeste e na época com menor ocorrência de chuvas, que é o final da primavera em ambas as regiões. Após ser plantada, a cana-de-açúcar adquire um comportamento semiperene, pois, depois de ser colhida pela primeira vez, ela pode ser submetida a sucessivos ciclos de crescimento e colheitas, sem ter que ser novamente plantada.

A cana-de-açúcar plantada entre os meses de janeiro a abril (maio a julho, no nordeste) permanecerá no campo por um intervalo de 13 a 16 meses, antes de ser colhida, sendo denominada “cana de ano e meio”. Quando plantada durante os meses de setembro e outubro, início da estação chuvosa nas regiões centro-sul e leste, e outubro e novembro na região nordeste, será denominada “cana de ano” e será colhida após 12 meses depois de plantada. A cana-de-açúcar plantada fora destes períodos precisa que as condições ambientais atendam às necessidades para o nascimento das sementes (TOWNSEND, 2000).

O clima ideal para o desenvolvimento da planta de cana-de-açúcar é aquele que apresenta duas estações distintas, uma quente e úmida, para proporcionar a germinação, o perfilhamento e o desenvolvimento vegetativo, seguida de outras duas estações, fria e seca, para promover a maturação e o acúmulo de sacarose nos colmos (GROFF, 2010).

As temperaturas mensais devem ficar entre 30 °C a 34 °C, o que favorece o acúmulo de açúcar. Sob temperaturas abaixo de 20 °C e acima de 35 °C o crescimento é muito lento e, além de 38 °C, o crescimento é nulo. A umidade em excesso compromete a produtividade e a falta de chuva provoca a morte da planta; o ideal é que, durante o crescimento da planta, a umidade esteja entre 80% e 85%, fator que favorece o alongamento rápido da cana. Durante o

amadurecimento, a umidade deve ficar entre 45% e 65%, favorecendo o acúmulo de açúcar na cana (FREITAS, 2007).

As plantas muito próximas competem por luz e, conseqüentemente, têm problemas com a fotossíntese. A luz não influencia a brotação da planta, mas sem luz não há perfilhamento nem crescimento da cana (TOWNSEND, 2000).

Os solos preferíveis são os planos, profundos, porosos, férteis, argilosos ou arenosos, sendo os últimos os melhores, pois auxiliam o acúmulo de açúcar pela planta. O pH entre 7 e 7,3 melhora a capacidade de absorção de nutrientes, principalmente cálcio e magnésio. Solos propensos a encharcamento podem provocar o apodrecimento da planta; entretanto, solos secos também podem provocar a morte da planta (TOWNSEND, 2000).

A cana-de-açúcar, assim como outras culturas, precisa de nutrientes e, além de carbono, hidrogênio e oxigênio, a planta necessita de nitrogênio (atraso no desenvolvimento vegetativo), fósforo (diminuição e afinamento do tamanho dos colmos), potássio (afinamento dos colmos), cálcio (as folhas podem morrer prematuramente), magnésio (apresenta lesões em forma de ferrugem), enxofre (estreitamento das folhas e afinamento dos colmos), boro (ressecamento das folhas), cloro (murchamento das folhas), cobre (afinamento das folhas), ferro (a planta inteira pode tornar-se clorótica), manganês (desfiamento das folhas), molibdênio (secagem prematura das folhas) e zinco (perfilhamento reduzido). A correta disposição dos nutrientes no solo ou adubo faz com que haja um aumento na produtividade da cana-de-açúcar (ORLANDO FILHO; MACEDO, 1994).

A alta concentração de CHO se dá, em sua maioria, pela presença de CNF, como a sacarose, que atua como fonte energética para o crescimento de leveduras epífitas anaeróbicas e resistentes a pH ácidos na ensilagem (WOOLFORD, 1984). Dessa forma, a sacarose é metabolizada e convertida em

CO₂, H₂O e etanol, caracterizando uma fermentação alcoólica (KUNG JUNIOR; SHAVER, 2001).

O consumo de compostos fermentescíveis, a formação e a liberação de CO₂, a lixiviação de efluentes e a produção de etanol acarretam perdas de MS significativas, que podem chegar a 35,3% (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991; ZOPOLLATTO et al., 2009).

Visando diminuir as perdas de MS, os estudos com inoculantes microbianos que inibem o crescimento de levedura e/ou metabolizam o etanol gerando ácidos orgânicos têm crescido e se intensificado nos últimos anos (ÁVILA et al., 2008, 2010, 2012, 2014; CARVALHO et al., 2014; VALERIANO et al., 2009).

2.5 Inoculantes microbianos

A utilização de inoculantes em silagens é feita com o objetivo de adicionar microrganismos benéficos para competir com a microbiota epífita e dominar a fermentação, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis deterioradores e formando produtos finais que estimulam o consumo da silagem (KUNG JUNIOR; STOKES; LIN, 2003). A silagem com inoculante microbiológico pode promover aumento do peso e maior produção de leite (KUNG JÚNIOR; MUCK, 1997), devido a um possível efeito sobre a microbiota ruminal (MUCK, 2008).

A atividade metabólica das BAL desempenha papel fundamental durante o processo fermentativo da silagem, sendo elas principais responsáveis pela preservação e qualidade do alimento. Os inoculantes microbianos utilizados em silagem compreendem bactérias homofermentativas e heterofermentativas, ou a combinação destas (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991).

As bactérias homofermentativas apresentam uma taxa de fermentação mais rápida, produzindo 2 mols de ácido lático a partir de 1 mol de glicose, o que ocasiona rápida acidificação do meio com perdas mínimas de MS, inibição de microrganismos indesejáveis, redução das taxas de proteólise, ácidos acético e butírico e maior recuperação de energia (KUNG JUNIOR; STOKES; LIN, 2003). Entretanto, pode agravar a instabilidade aeróbica de silagens, provavelmente pela diminuição de ácido acético e, conseqüentemente, menor inibição de fungos após a abertura do silo (DREHUIS; WIKSELAAR, 2000).

Bactérias heterofermentativas produzem ácidos lático e acético, etanol e CO₂, reduzindo o pH lentamente, e ocasionam perdas devido ao CO₂ liberado. Porém, são efetivos no controle de fungos (ZOPOLLATTO et al., 2009), principalmente pela produção de ácido acético, que retarda o crescimento desses microrganismos e pode ocasionar a morte celular (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991). Além da produção do ácido acético, existem cepas heteroláticas capazes de degradar o produto 1,2 propanodiol a 1-propanol e ácido propiônico que, em combinação com o ácido acético, apresentam excelente efeito na inibição de fungos deterioradores na estabilidade aeróbica (KROONEMAN et al., 2002).

A obtenção de sucesso no uso de inoculantes microbiológicos em silagens está relacionada à compatibilidade entre a cepa adicionada e a forragem inoculada (SAARISALO et al., 2007; ZOPOLLATTO et al., 2009).

2.5.1 Inoculante microbiano em silagem de milho

O uso de inoculante em silagem de milho é muito discutido na literatura. Alguns autores, como Jobim et al. (2007), Kung Junior e Shaver (2001) e Rodrigues et al. (2004), consideram justificável o uso de inoculante, principalmente por acelerarem a conclusão da fermentação, reduzirem as perdas

e manterem alto o teor de carboidrato solúvel na silagem. Contudo, Rabelo e Rezende (2014) não acham necessária a aplicação de inoculante, desde que a planta tenha sido colhida com MS entre 25% e 30% e apresente população epífita composta por *Lactobacillus*, já que a adição nem sempre acarreta respostas consistentes e/ou estatisticamente significativas.

Embora haja muita diversidade nos resultados encontrados, em estudos cujos autores acreditam que inoculantes tragam benefícios para a silagem, concluiu-se que inoculantes homoláticos não são capazes de competir de forma eficiente com a microbiota epífita do milho, quando comparados a inoculantes heterofermentadores (KRISTENSEN et al., 2010). Entretanto, esse assunto ainda precisa ser mais bem estudado, já que existe dificuldade em acompanhar a viabilidade do inoculante durante a fermentação. Por ser uma silagem propensa à deterioração aeróbia, a utilização de inoculantes contendo cepas heterofermentativas é mais indicada para essa silagem. A espécie *Lactobacillus buchneri* é uma heterofermentadora muito estudada e utilizada em silagens de milho (DRIEHUIS; SPOELSTRA; COLE, 1996), e em trabalhos recentes, como de Rabelo e Rezende (2014), Reich e Kung Junior (2010) e Tabacco et al. (2011), comprovou-se que silagens inoculadas com este lactobacilo apresentaram menor perda de MS e maior estabilidade aeróbica.

2.5.2 Inoculante microbiano em silagem de cana-de-açúcar

Na silagem de cana-de-açúcar, a principal dificuldade são as perdas de MS durante toda a fermentação, em função do crescimento de leveduras. Assim como na silagem de milho, são estudados muitos tipos de inoculantes microbianos para melhorar a qualidade da silagem e os melhores resultados são vistos com cepas heterofermentativas, como o *L. buchneri* (ÁVILA et al., 2010; ZOPOLLATTO et al., 2009). Entre os trabalhos revisados, o aumento do ácido

acético é a principal diferença em relação à silagem não inoculada (ÁVILA et al., 2009a; PEDROSO et al., 2011).

Os estudos feitos por Ávila et al. (2009b) demonstraram que a utilização do *L. buchneri* é recomendada, pois promove maior produção dos ácidos acético e propiônico, redução da população de levedura e, conseqüentemente, menores perdas e melhor estabilidade aeróbica de silagens. No trabalho de Moreira et al. (2014), a inoculação de *L. buchneri* em silagem de cana-de-açúcar não mostrou mudança no comportamento dos animais em relação ao tempo gasto em alimentação, ruminação e descanso, mas alterou o tempo de mastigação total por kg de MS. Portanto, não modificou o consumo de nitrogênio dos animais, mas proporcionou maior síntese ruminal de nitrogênio microbiano. Em relação ao trabalho de Schmidt et al. (2014), a inoculação de *L. buchneri* alterou o padrão de fermentação, aumentando a produção de ácido acético, reduzindo as perdas de nutrientes de silagem e melhorando a eficiência alimentar dos animais.

2.5.3 Novas cepas bacterianas usadas como inoculante microbiológico

A busca por novos inoculantes ou por combinações de produtos que apresentem efeito sinérgico na prevenção de perdas durante a ensilagem torna-se cada vez mais necessária (MUCK, 2008).

A cepa, para ser considerada um bom inoculante, deve preencher alguns critérios, como rápido crescimento na forragem, habilidade para competir com a microbiota epífita da planta, combater a deterioração após a abertura do silo e aumentar a estabilidade aeróbica das silagens. Esses critérios podem ser avaliados pela capacidade do microrganismo de utilizar o mínimo de carboidratos presentes na forragem e produzir metabólitos de interesse, principalmente para a conservação da silagem (SAARISALO et al., 2007; ZOPOLLATTO et al., 2009). Para que o pH da silagem reduza rapidamente, são

necessárias cerca de 108 BAL, porém, esta concentração é superior à suprida pelos inoculantes microbiológicos. Assim, o inoculante deve apresentar rápida taxa de crescimento na forrageira recém-armazenada (MCDONALD; HENDERSON; HERONS, 1991).

A pesquisa por novos inoculantes é de suma importância, principalmente pelo fato de os resultados encontrados na literatura serem divergentes, provavelmente em decorrência da variação na microbiota epifítica da forragem (SCHMIDT, 2009). Os resultados que demonstram ineficiência dos inoculantes atuais, comerciais e não comerciais, podem ser observados nos trabalhos de Muck (2008), que utilizou o inoculante comercial *L. buchneri*, juntamente com um inoculante composto pelas cepas *L. brevis*, *Enterococcus faecium* e *L. plantarum*, em silagem cana-de-açúcar. No trabalho de Freitas et al. (2006), os inoculantes *L. plantarum* e *L. buchneri* aplicados em silagem de cana-de-açúcar também não foram eficientes. Pedroso, Freitas e Souza (2000) utilizaram a mistura comercial contendo *L. plantarum*, *S. faecium* e *P. acidactili* em ensilagem de sorgo e também não obtiveram resultado positivo. Outro trabalho que mostrou ineficiência dos inoculantes atuais foi o de Calescra e Gai (2012), no qual os autores aplicaram a mistura comercial contendo *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. buchneri*, *P. acidilactici*, *E. faecium* e complexo multienzimático celulolítico em silagem de milho.

2.5.3.1 *Lactobacillus hilgardii*

Durante muitos anos, os inoculantes contendo BAL homofermentativos foram preferidos, pois produzem maior quantidade de ácido lático, resultando na queda mais rápida do pH e, conseqüentemente, silagens mais preservadas. No entanto, pesquisadores têm se voltado para o estudo de cepas de BAL heterofermentativas, que produzem ácidos acético e propiônico e são eficientes

em inibir o crescimento de leveduras e fungos filamentosos (KUNG JUNIOR; STOKES; LIN, 2003).

O *Lactobacillus hilgardii*, anteriormente classificado como *Lactobacillus vermiforme*, pertence ao grupo de BAL heterofermentativas, sendo um heterofermentador obrigatório. O *L. hilgardii* é um bacilo anaeróbio facultativo, gram-positivo, catalase negativa, produtor de ácidos propiônico, acético e láctico, etanol e CO₂, com temperatura de crescimento entre 15 °C e 45 °C, sendo a ótima entre 20 °C e 37 °C, sensível ao dióxido de enxofre, fermentador de maltose na presença de extrato de levedura, tolerante a pH ácido, altas concentrações de etanol (20%) e ambientes com concentrações diluídas de nutrientes (DICKS; ENDO, 2009).

Além dessas características, o *L. hilgardii* é capaz de produzir uma capa protetora S externamente à parede celular (DOHM et al., 2011), constituída, basicamente, de proteína e semelhante à encontrada em Archaea (HYNÖNEN; PALVA, 2013). O *L. hilgardii* já foi encontrado durante a vinificação e o armazenamento de vinho e em produtos lácteos (DICKS; ENDO, 2009).

Estudos têm demonstrado que existem diferenças metabólicas entre cepas de *L. hilgardii*. O trabalho de Arena et al. (2008) confirmou a capacidade de uma cepa de *L. hilgardii*, isolada de vinho argentino, em degradar agmatina em putrecina (aminas biogênicas); por outro lado, no trabalho de García-Ruiz et al. (2011) comprovou-se que algumas cepas de *L. hilgardii* isoladas de vinho têm o potencial de metabolizar as aminas biogênicas histamina, tiramina e putrecina, não sendo capazes de produzir esses metabólitos, mesmo com o meio de cultivo contendo os seus aminoácidos precursores (histidina, tirosina e ornitina, respectivamente). Segundo García-Ruiz et al. (2011), a capacidade do *L. hilgardii* em metabolizar aminas biogênicas sugere que sua aplicação em silagens pode proporcionar um alimento de boa qualidade, já que a deterioração da forragem ensilada produz amina como metabólito, o que interfere no sabor e

no odor do alimento, reduzindo seu consumo (REIS; TEIXEIRA; SIQUEIRA, 2006) e apresentando características tóxicas aos animais (CARDOZO et al., 2013). As aminas mais encontradas em silagens são putrecina, histamina, tiramida e cadaverina, representando cerca de 90% do total de aminas presentes nas silagens (VAN OS; JAILLER; DULPHY, 1996).

Arena et al. (2012) demonstraram que o *L. hilgardii* é capaz de degradar o aminoácido arginina e produzir amônia, característica que pode ser benéfica, considerando que o metabolismo desse aminoácido disponibiliza energia adicional para o crescimento da BAL e a amônia produzida, apesar de apresentar efeito neutralizante sobre ácidos desejáveis (PEREIRA et al., 2007), tem controle sobre o crescimento de leveduras e fungos filamentosos (SIQUEIRA et al., 2007). Pires et al. (2003) constataram que amônia anidra influencia positivamente o consumo da silagem.

Alberto, Farías e Nadra (2001) descrevem que o *L. hilgardii* degrada ácido gálico, quando presente em baixas concentrações no meio. O ácido gálico pode estar em sua forma livre ou constituindo o tanino (CAMPOS; COUTO; HOGG, 2003), que é caracterizado como sendo um composto fenólico, com alto peso molecular e suficientes grupos hidroxifenólicos para formarem efetivos e fortes complexos com proteínas e outras macromoléculas (REED, 1995). Segundo Bossi et al. (2007), o tanino é responsável por reduzir tanto o consumo quanto a digestibilidade do alimento forrageiro, já que se liga a proteínas, formando complexos insolúveis.

2.5.3.2 *Lactobacillus hilgardii* como inoculante microbiano

Na literatura, pouco se fala sobre o uso de *L. hilgardii* em silagens, porém, os trabalhos iniciais realizados por Ávila et al. (2014) e Carvalho et al. (2014) demonstraram que as silagens de cana-de-açúcar e milho,

respectivamente, apresentaram maiores teores de ácidos acético e propiônico e 1,2-propanodiol. Ávila et al. (2014) verificaram que as silagens de cana-de-açúcar apresentaram maior população de BAL, inversamente proporcional à população de leveduras e Carvalho et al. (2014) observaram, nas silagens de milho, teores baixos de etanol durante toda a fermentação e que as concentrações de açúcar reduziram rapidamente no início da fermentação, o que coincide com a alta população de BAL observada no mesmo período. Porém, no final da avaliação, ocorreu grande redução nas populações desses microrganismos e maiores concentrações de carboidrato solúvel. Tais resultados mostraram que as silagens apresentaram menores perdas de carboidratos e MS, e maior estabilidade aeróbica.

Como já mencionado, *L. buchneri* melhora substancialmente a estabilidade aeróbia de silagens e, segundo Heintz et al. (2012), o metabolismo de *L. hilgardii* apresenta algumas semelhanças como de *L. buchneri*, dentre elas, a classificação como heterofermentadores obrigatórios, a capacidade de produzir 1,2-propanodiol e de o genoma do *L. buchneri* codificar cerca de 8 proteínas precursoras da camada S, que pode estar presente em algumas cepas de *L. hilgardii*.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A preocupação em produzir alimento volumoso, principalmente no período seco do ano, tem aumentado a utilização da silagem. Contudo, a qualidade da silagem sofre forte influência, principalmente, da temperatura, da umidade, do fotoperíodo, da radiação solar, do estágio de maturação e das técnicas de ensilagem.

Na literatura, há muita divergência sobre o uso de inoculantes atuais em silagens e, nesse sentido, estudos para selecionar novas cepas para inoculantes microbiológicos estão se tornando cada vez mais necessários.

Para que a cepa seja selecionada como inoculante, é necessário que ela seja compatível com a forragem, ou seja, combata a microbiota epífita, controlando a fermentação e acidificando a forragem rapidamente.

O *L. hilgardii* não é muito estudado como inoculante microbiano, mas estudos iniciais mostram que ele propicia uma fermentação adequada da forragem, diminuindo perdas e melhorando a estabilidade aeróbica.

REFERÊNCIAS

- AFUAKWA, J. J.; CROOKSTON, R. K. Using the kernelmilk line to visually monitor grain maturity in maize. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 4, p. 687-691, 1984.
- ALBERTO, M. R.; FARIÁS, M. E.; NADRA, M. C. M. Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4359-4363, Sept. 2001.
- ALLEN, M. S.; OBA, M.; CHOI, B. R. Silage: feed costs and performance affected by type of corn hybrid. **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 69, n. 28, p. 14-15, 1997.
- ARENA, M. E. et al. Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* XB isolated from wine. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, p. 158-165, July 2008.
- ARENA, M. E. et al. Wine composition plays an important role in the control of carcinogenic precursor formation by *Lactobacillus hilgardii* X (1) B. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, p. 142-148, June 2012.
- ÁVILA, C. L. da S. et al. Aerobic stability of sugar cane silages with a novel strain of *Lactobacillus* sp. isolated from sugar cane 1. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 41, n. 2, p. 249-255, 2012.
- ÁVILA, C. L. da S. et al. Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculants. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 1, p. 25-32, 2010.
- ÁVILA, C. L. da S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 384-394, Dec. 2009a.
- ÁVILA, C. L. da S. et al. Estabilidade aeróbia de silagens de capim-mombaça tratadas com *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 5, p. 779-787, 2009b.

ÁVILA, C. L. da S. et al. Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 255-261, nov. 2008.

ÁVILA, C. L. da S. et al. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 2, p. 940-951, Feb. 2014.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von; OUWEHAND, A. (Ed.). **Lactic acid bacteria**. 3rd ed. New York: M. Dekker, 2004. p. 1-63.

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

BEMRAH, N. et al. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 37, n. 1/4, p. 129-145, Dec. 1998.

BERNARDES, T. F. **Controle da deterioração aeróbia de silagens**. Jaboticabal: UNESP, 2006. 116 p.

BOLSEN, K. Silage: basic principles. In: BARNES, R. F.; MILLER, D. A.; NELSON, C. J. (Ed.). **Forages**. 5th ed. Ames: Iowa State University, 1996. p. 163-176.

BORREANI, G.; TABACCO, E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 6, p. 2620-2629, June 2010.

BOSSI, A. et al. Effect of tannic acid on *Lactobacillus hilgardii* analysed by a proteomic approach. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 3, p. 787-95, Mar. 2007.

CALESCURA, P. L.; GAI, V. F. Uso de inoculante microbiano em silagem de milho. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 1, n. 2, p. 67-74, 2012.

CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A.; HOGG, T. A. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 167-174, Jan. 2003.

CARDOZO, M. et al. Artigo aminas biogênicas: um problema de saúde pública. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 5, n. 2, p. 149-168, 2013.

CARVALHO, B. F. et al. Aerobic stability of sugar-cane silage inoculated with tropical strains of lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, Mar. 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gfs.12117/abstract>>. Acesso em: 1 nov. 2014.

CRUZ, J. C. et al. **Manejo da cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006. 12 p.

CRUZ, J. C. et al. **Produção e composição bromatológica de cultivares de milho para silagem**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2005. 4 p.

DAWSON, L. E. R. et al. The effects of wilting grass before ensiling on silage intake. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 237-247, Sept. 1999.

DEMARQUILLY, C. Ensilage et contamination du lait par les spores butyriques. **INRA Productions Animales**, Paris, v. 11, n. 5, p. 359-364, 1998.

DICKS, L. M. T.; ENDO, A. Taxonomic status of lactic acid bacteria in wine and key characteristics to differentiate species. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 30, n. 1, p. 72-90, 2009.

DOHM, N. et al. Molecular and biochemical properties of the S-layer protein from the wine bacterium *Lactobacillus hilgardii* B706. **Archives of Microbiology**, New York, v. 193, n. 4, p. 251-261, Apr. 2011.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **The Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 22, n. 4, p. 212-216, 2000.

DRIEHUIS, F.; SPOELSTRA, S. F.; COLE, S. C. J. Improving aerobic stability by inoculation with *Lactobacillus buchneri*. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11., 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth: ISC, 1996. p. 106-107.

DRIEHUIS, F.; TE GIFFEL, M. C. Butyric acid bacteria spores in whole crop maize silage. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 14., 2005, Belfast. **Proceedings...** Belfast: ISC, 2005. p. 271.

ECKARD, S. et al. Incidence of Fusarium species and mycotoxins in silage maize. **Toxins**, New York, v. 3, n. 8, p. 949-967, Aug. 2011.

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**, Den Haag, v. 159, n. 2, p. 281-289, Feb. 2005.

FANCELLI, A. L. et al. **População e distribuição espacial de plantas de milho: estratégias de manejo para alta produtividade**. Piracicaba: ESALQ, 2003. 116 p.

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

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

FREITAS, C. **Qualidade da matéria prima**. Brasília: EMBRAPA, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_138_22122006154842.html>. Acesso em: 10 nov. 2014.

GARCÍA-RUIZ, A. et al. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 148, n. 2, p. 115-120, Aug. 2011.

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

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

GROFF, A. M. **Fatores de produção agropecuária: apostila, transparências e notas de aulas**. Campo Mourão: FECILCAM, 2010.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: _____. **The Prokaryotes, an evolving electronic resource for the microbiological community**. Berlin: Springer Verlag, 2003. p. 320-403.

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

HENDERSON, N. Silage additives. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 35-56, 1993.

HYNÖNEN, U.; PALVA, A. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 12, p. 5225-5243, June 2013.

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

JONSSON, A. Growth of *Clostridium tyrobutyricum* during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 54, n. 3, p. 557-568, 1991.

JONSSON, A.; PAHLOW, G. Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. **Animal Research and Development**, Brisbane, v. 20, n. 3, p. 7-22, 1984.

JUNGES, D. **Aditivo microbiano na silagem de milho em diferentes tempos de armazenamento e avaliação da estabilidade aeróbica por termografia em infravermelho**. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

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

KONOSONOKA, I. H. et al. Incidence of *Listeria* spp. in Dairy Cows Feed and Raw Milk in Latvia. **ISRN Veterinary Science**, Cairo, v. 2012, p. 1-5, Jan. 2012.

- KRISTENSEN, N. B. et al. 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, n. 8, p. 3764-3774, Aug. 2010.
- KROONEMAN, J. et al. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 639-646, Mar. 2002.
- KUNG JÚNIOR, L.; MUCK, R. **Animal responses to silage additive**. Silage: Field to Feedbunk, 1997. 10 p.
- KUNG JUNIOR, L.; SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. **Focus on Forage**, Wisconsin, v. 3, n. 13, p. 1-5, 2001.
- KUNG JUNIOR, L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA, 2003. p. 305-360.
- LAMBERT, R. J.; STRATFORD, M. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 157-164, Jan. 1999.
- LINDGREN, S. et al. Effects of inoculants, grain, and formic acid on silage fermentation. **Swedish Journal of Agricultural Research**, Oslo, v. 13, n. 2, p. 91-100, 1983.
- 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, 19., 2002, La Rochelle. **Proceedings...** La Rochelle, 2002. p. 503-511.
- MAHANNA, B. Proper management assures high-quality silage, grains. **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 10, p. 12-56, Jan. 1994.
- MANSFIELD, M. A.; JONES, A. D.; KULDAU, G. A. Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* *Mycotoxins*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 3, p. 330-336, Mar. 2008.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERONS, S. J. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Marlow: Chalcomb, 1991. 340 p.

MCENIRY, J. et al. The microbiological and chemical composition of silage over the course of fermentation in round bales relative to that of silage made from unchopped and precision-chopped herbage in laboratory silos. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 63, n. 3, p. 407-420, Sept. 2008.

MOISIO, T.; HEIKONEN, M. Lactic acid fermentation in silage preserved with formic acid. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 47, n. 1/2, p. 107-124, May 1994.

MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 454-460, 1983.

MOREIRA, J. V. et al. Sugar cane fresh or ensiled with or without bacterial additive in diets for dairy cows. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 36, n. 4, p. 385-391, Sept. 2014.

MUCK, R. E. Advances in inoculants for silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL PRODUCTION UNDER GRAZING, 2., 2008, Viçosa, MG. **Proceedings...** Viçosa, MG: UFV, 2008. 1 CD-ROM.

MUCK, R. E.; BOLSEN, K. K. Silage preservation and additive products. In: _____. **Field guide and silage management in North America**. Des Moines: National Feed Ingredients Association, 1991. p. 105-126.

MÜLLER, H. M.; AMEND, R. Formation and disappearance of mycophenolic acid, patulin, penicillic acid and PR toxin in maize silage inoculated with *Penicillium roqueforti*. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 50, n. 3, p. 213-225, 1997.

NEUMANN, M. et al. Ensilagem de milho (*Zea mays*, L.) em diferentes alturas de corte e terminação de bovinos em confinamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 3, p. 379-397, 2007.

NISHINO, N. Aerobic stability and instability of silages caused by bacteria. In: DANIEL, J. L. P.; ZOPOLLATTO, M.; NUSSIO, L. G. (Ed.). **Process international symposium forage quality conservation**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários "Luiz de Queiroz", 2011. p. 127-141.

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

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; DIAS, F. N. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 1., 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO, 2001. p. 127-145.

NUSSIO, L. G.; MANZANO, R. P. Silagem de milho. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS: ALIMENTAÇÃO SUPLEMENTAR, 7., 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1999. p. 27-46.

ORLANDO FILHO, J.; MACEDO, N. Seja o doutor do seu canavial. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, n. 67, p. 1-17, set. 1994.

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

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. Silage fermentation processes and their manipulation. In: FAO ELECTRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE SILAGE, 1., 2001, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2001b. p. 1-28.

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

PEDROSO, A. D. F.; FREITAS, A. R. de; SOUZA, G. B. de. Efeito de inoculante bacteriano sobre a qualidade da silagem e perda de matéria seca durante a ensilagem de sorgo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 1, p. 48-52, jan./fev. 2000.

PEDROSO, A. D. F. et al. Fermentation parameters, quality and losses in sugarcane silages treated with chemical additives and a bacterial inoculant. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 11, p. 2318-2322, 2011.

PEREIRA, E. S. et al. Avaliação da qualidade nutricional de silagens de milho (*Zea mays*, L). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 8-12, 2007.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 8, p. 2178-2184, Aug. 1998.

PIONEER SEMENTES. **Silagem de milho**. 2. ed. Santa Cruz do Sul, 1993. (Informe Técnico, 6). Disponível em:
<<http://www.pioneersementes.com.br/Media-Center/Pages/Download-Center.aspx?gclid=COboy-HW6cQCFdcRgQodJI4A9A&CurrentPage=1>>.
Acesso em: 10 nov. 2014.

PIRES, A. J. V. et al. Avaliação do consumo de silagens de sorgo tratadas com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio na alimentação de novilhas $\frac{3}{4}$ Indubrazil / Holandês. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1525-1531, 2003.

RABELO, C.; REZENDE, A. Silagens de milho inoculadas microbiologicamente em diferentes estádios de maturidade: perdas fermentativas, composição bromatológica e digestibilidade. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 368-373, 2014.

RANDBY, Å. T.; SELMER-OLSEN, I.; BAEVRE, L. Effect of ethanol in feed on milk flavor and chemical composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 2, p. 420-428, Feb. 1999.

REED, J. D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 5, p. 1516-1528, May 1995.

REICH, L. J.; KUNG JUNIOR, L. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 159, n. 3/4, p. 105-109, Aug. 2010.

REIS, R. A.; TEIXEIRA, I. A. M. A.; SIQUEIRA, G. R. Impacto da qualidade da forragem na produção animal. In: SIMPÓSIO REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006. 1 CD-ROM.

RENTERO, N. Qualidade total: nova referência das silagens. **Balde Branco**, São Paulo, v. 34, n. 403, p. 22-28, 1998.

- RESTLE, J. et al. Manipulação da altura de corte da planta de milho (*Zea mays*, L.) para ensilagem visando a produção do novilho superprecoce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, p. 1235-1244, 2002.
- RICHARD, E. et al. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 12, p. 2420-2425, Dec. 2007.
- RODRIGUES, P. H. M. et al. Avaliação do uso de inoculantes microbianos sobre a qualidade fermentativa e nutricional da silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 3, p. 538-545, maio/jun. 2004.
- ROSSI, F.; DELLAGLIO, F. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 5, p. 1707-1715, Nov. 2007.
- SAARISALO, E. et al. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 327-336, Feb. 2007.
- SCHMIDT, P. Improved efficiency of sugarcane ensiling for ruminant supplementation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2009, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2009. p. 47-72.
- SCHMIDT, P. et al. Effects of *Lactobacillus buchneri* on the nutritive value of sugarcane silage for finishing beef bulls 1. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 43, n. 1, p. 8-13, 2014.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.
- SIQUEIRA, G. R. et al. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 6, p. 2000-2009, 2007.
- SOEST, P. van. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. New York: Cornell University, 1994. 476 p.
- SPOELSTRA, S. F. Inhibition of clostridial growth by nitrate during the early phase of silage fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 34, n. 2, p. 145-152, 1983.

TABACCO, E. et al. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 11, p. 5589-5598, Nov. 2011.

TAŞÇI, F.; TÜRÜTOĞLU, H.; ÖĞÜTÇÜ, H. Burdur yöresinde üretilen süt ve silajlarda *Listeria* türlerinin araştırılması. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, Kars, v. 16, p. 93-97, 2009.

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

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

TOWNSEND, C. R. **Recomendações técnicas para o cultivo da cana-de-açúcar forrageira em Rondônia**. Porto Velho: EMBRAPA Rondônia, 2000. 5 p.

VALERIANO, A. R. et al. Efeito da adição de *Lactobacillus* sp. na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 6, p. 1009-1017, 2009.

VAN OS, M.; JAILLER, M.; DULPHY, J. P. The influence of ammonia, biogenic amines and gamma-aminobutyric acid on grass silage intake in sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 76, n. 3, p. 347-358, Sept. 1996.

VASCONCELOS, R. C. **Resposta de milho e soro para silagens a diferentes alturas de cortes e datas de semeadura**. Lavras: UFLA, 2004. 124 p.

VELHO, J. P. et al. Composição bromatológica de silagens de milho produzidas com diferentes densidades de compactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 5, p. 1532-1538, 2007.

VILAR, M. J. et al. Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 11, p. 5083-5088, Nov. 2007.

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

WILKINSON, J. M. Silage and animal health. **Natural Toxins**, New York, v. 7, n. 6, p. 221-232, 1999.

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

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York: M. Dekker, 1984. 350 p.

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

ZHANG, T. et al. Effects of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 965-971, Feb. 2009.

ZOPOLLATTO, M. et al. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, p. 170-189, jul. 2009. Número especial.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

**PERFIL FERMENTATIVO E ESTABILIDADE AERÓBICA DE
SILAGEM DE MILHO (*Zea mays* L.) CRESCIDO EM DÉFICIT
HÍDRICO, INOCULADA COM *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170**

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é a forragem mais utilizada na produção de silagem. O *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 foi anteriormente isolado em silagem de cana-de-açúcar e apresentou bons resultados nesta forragem e em silagem de milho. Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar seu efeito na forragem de milho crescido em déficit hídrico. Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial tipo 2 (silagem com e sem inoculante) x 4 (tempos de abertura), com 3 repetições. A população viável de *L. hilgardii* CCMA 0170 inoculada foi de 6 log UFC g⁻¹ de forragem. Foram avaliados o teor de MS, CHO, FDN, PB, os valores de pH, as populações de BAL, leveduras e fungos filamentosos, as concentrações dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico, etanol e 1,2 propanodiol e a estabilidade aeróbicas das silagens após 90 dias de fermentação. A planta de milho apresentou teor de MS de 366,55 g⁻¹ kg MF. Os teores de PB e CHO apresentaram-se dentro do recomendado (mínimo de 70 e 60 g kg⁻¹ MS, respectivamente). O teor de FDN situou-se dentro do relatado na literatura. A contagem de BAL e fungos da microbiota epífita divergiu das encontradas na literatura. O conteúdo metabólico presente na forragem foi semelhante ao encontrado na literatura, com exceção do etanol (acima do encontrado na literatura). O teor médio de FDN, em todos os tempos de abertura, na silagem controle, foi de 594,44 g kg⁻¹ MS e, na silagem inoculada, foi de 577,78 g kg⁻¹ MS. No final da ensilagem, o teor de FDN foi 559,92 g kg⁻¹ MS. O teor de MS atingiu 362,20 g kg⁻¹, no final da fermentação. As perdas de MS por efluente alcançaram 1,23%. O teor de CHO na silagem inoculada reduziu para 4,69 g kg⁻¹ MS e, na silagem controle, para 1,94 g kg⁻¹ MS no final do processo fermentativo. O valor do pH atingiu 3,75 (inoculada) e 3,84 (controle), aos 90 dias de fermentação. A população de BAL na silagem controle e inoculada atingiu 8,58 e 8,60 log UFC g⁻¹, respectivamente. As populações de leveduras e fungos filamentosos reduziram na silagem inoculada e foram menores que o mínimo detectável de 2 log UFC g⁻¹. A concentração do ácido láctico, independente dos tempos de abertura, na silagem controle, foi de 49,33 g kg⁻¹ MS e, na silagem inoculada, de 59,85 g kg⁻¹ MS. Considerando os tempos de abertura, foi de 72,46 g kg⁻¹ MS. A concentração de ácido acético atingiu 12,93 g kg⁻¹ MS na silagem inoculada e 4,92 g kg⁻¹ MS na silagem controle. A concentração final de etanol foi de 17,33 g kg⁻¹ MS na silagem com inoculante e 20,36 g kg⁻¹ MS na silagem controle. A concentração de 1,2 propanodiol, aos 90 dias de fermentação, atingiu 0,0127 g kg⁻¹ MS. A concentração de ácido propiônico alcançou 2,79 g kg⁻¹ MS, ao final da ensilagem. O ácido butírico chegou à concentração de 1,39 g kg⁻¹ MS. As temperaturas da silagem inoculada com o *L. hilgardii* CCMA 0170 não apresentaram elevação durante todo o tempo exposto ao ar, ao contrário da silagem controle, que, com três dias de

exposição, apresentou 2 °C acima da temperatura ambiente. A população média, ao final do período de exposição aeróbica, nas silagens controle e inoculada, de BAL, foi de 7,18 log UFC g⁻¹ e de 7,63 log UFCg⁻¹; de levedura, de 5,6 log UFC g⁻¹ e de 1,06 log UFC g⁻¹ e de fungos filamentosos, de 4,83 log UFC g⁻¹ e de 1,12 log UFC g⁻¹, respectivamente. A inoculação de *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 melhorou a qualidade da silagem de milho com baixa umidade.

Palavras-chave: Inoculante, *Lactobacillus hilgardii*, silagem de milho.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é a forragem mais utilizada na produção de silagem, especialmente pelos teores de matéria seca (MS) e carboidratos solúveis em água (CHO) adequados e pelo baixo poder tampão (JALČ et al., 2009; SANTOS; ÁVILA; SCHWAN, 2013). Contudo, a qualidade da silagem sofre forte influência, principalmente, da temperatura, da umidade, do fotoperíodo, da radiação solar, do estágio de maturação e da estabilidade aeróbica, já que as características adequadas da planta de milho possibilitam maior crescimento de microrganismos indesejáveis (BASSO et al., 2012; NISHINO et al., 2003).

O processo de conservação da forragem ocorre pela fermentação anaeróbica de bactérias produtoras de ácidos orgânicos, que podem ser naturais da planta ou decorrentes da adição de inoculante, normalmente contendo bactérias do ácido láctico (BAL), que são aplicados com o objetivo de diminuir o tempo de acidificação da forragem, as perdas energéticas e a instabilidade aeróbica da silagem (ARAGÓN; JATKAUSKAS; VROTNIAKIENĖ, 2012; GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010; MUGLALI et al., 2012; ZHANG et al., 2009).

Os inoculantes microbianos utilizados em silagem compreendem bactérias homofermentativas, heterofermentativas ou a combinação destas. Na ensilagem do milho, é recomendada a utilização de bactérias heterofermentativas, que produzem maiores quantidades de ácido acético e, assim, são efetivas no controle de fungos, durante a exposição da silagem ao ar (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

Uma cepa bacteriana para ser utilizada como inoculante tem que ser compatível com a forragem e, assim, promover rápida queda do pH, competir com a microbiota epífita, sobreviver durante a ensilagem, melhorar a

estabilidade aeróbica, inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis e minimizar as perdas energéticas. A compatibilidade da cepa pode ser avaliada pela capacidade do microrganismo de utilizar o mínimo de carboidratos presentes na forragem e produzir metabólitos de interesse, principalmente para a conservação da silagem (SAARISALO et al., 2007; ZOPOLLATTO; DANIEL; NUSSIO, 2009).

O uso de *Lactobacillus hilgardii* como inoculante é pouco estudado, porém, os trabalhos iniciais realizados por Ávila et al. (2014) e Carvalho et al. (2014) demonstraram que as silagens de cana-de-açúcar e de milho apresentaram maiores teores de ácidos acético e propiônico e 1,2-propanodiol, respectivamente. O *L. hilgardii* CCMA 0170 foi isolado de silagem de cana-de-açúcar por Ávila et al. (2009), contudo, é importante conhecer seu efeito em outros tipos forragens, visto que os resultados encontrados com os inoculantes atuais são divergentes. Considerando a necessidade de estudos com novas cepas microbianas e o bom desempenho do *L. hilgardii* CCMA 0170 em silagem de cana-de-açúcar, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da inoculação de *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 em silagens de milho que se desenvolveram em época de déficit hídrico, no sul do país, de planta inteira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reativação da cepa de *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170

A cepa *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 estava armazenada a 80 °C negativos. A reativação foi realizada em tubo contendo 5 mL de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (HYMEDIA®), incubado, por 48 horas, a 35 °C. Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL da cultura foi espalhada em placa de Petri contendo 20 mL de ágar MRS, para a verificação da pureza.

2.2 Avaliação do perfil fermentativo das silagens

2.2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) em um esquema fatorial tipo 2 (controle e inoculada) x 4 (tempos de aberturas), com 3 repetições. Os tempos de abertura foram de zero (forragem), 10, 60 e 90 dias de fermentação. Seis silos foram montados para cada tempo, sendo três para as silagens inoculadas e três para os controles. Em cada tempo de abertura foram feitas amostragens das silagens para análise químico-bromatológica e avaliação da microbiota.

2.2.2 Condições da forragem, silos laboratoriais e inoculante

O milho foi colhido em estágio da metade a dois terços da linha do leite. O milho cresceu durante o período de novembro de 2013 e janeiro de 2014, data não adequada para o plantio e a colheita de milho, devido, principalmente, ao estresse hídrico dessa época anual, acarretando uma forragem seca.

Os silos experimentais eram cilindros compostos de cloreto de polivinila (PVC), com 10 cm de diâmetro, 60 cm de comprimento, capacidade para 3 kg de forragem e válvulas de Bunsen para a liberação do gás formado pela fermentação.

O inoculante foi crescido em sucessivos cultivos, até atingir uma população viável de $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de forragem, população que foi verificada por meio de plaqueamento em superfície no meio MRS. Para que o inoculante estivesse na população $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ na forragem, no momento da ensilagem, 33 mL da biomassa fresca do inoculante foram homogeneizados com 80 mL de água destilada e pulverizados sobre a forragem a ser ensilada. O mesmo volume de água destilada foi adicionado ao tratamento controle, para garantir igual umidade em ambas as silagens.

2.2.3 Análises químico-bromatológicas das silagens

Inicialmente, as amostras da forragem e das silagens foram pré-secas em estufa de ventilação forçada, a $55 \text{ }^\circ\text{C}$, por 72 horas e, em seguida, foram moídas em moinho tipo Willey com malha de 1 mm (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1990).

A quantificação das fibras de detergente neutro (FDN) foi realizada conforme Pell e Schofield (1993). A análise dos CHO foi feita pelo método colorimétrico, conforme Dubois et al. (1956). A determinação do pH foi realizada a partir do mesmo extrato utilizado para o estudo microbiológico, por meio da leitura em potenciômetro digital (Digimed Analítica, modelo 20®), conforme Cherney e Cherney (2003). A determinação dos teores de proteína bruta (PB) e MS total foi feita conforme a AOAC (1990). A perda de MS por efluente foi calculada a partir da pesagem do silo, antes e depois do processo fermentativo.

2.2.4 Análise dos metabólitos nas silagens

As amostras de 25 g foram diluídas em 225 mL de água destilada estéril e homogeneizada em misturador orbital Tecnal – TE140, durante 20 minutos, a 150 rotações por minuto (RPM). Em seguida, 2 mL do extrato foram retirados e acidificados com 0,01 mL de solução de ácido sulfúrico 50% (vol/vol), promovendo a parada total do metabolismo microbiano na amostra (quenching), de acordo com metodologia descrita por Fussell e McCalley (1987).

Os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico, etanol e 1,2 propanodiol foram determinados por HPLC, de acordo com metodologias citadas por Duarte et al. (2009).

O cromatógrafo utilizado foi o Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp. Japão) e a identificação dos compostos foi determinada a partir das curvas de calibração dos padrões conhecidos. A coluna foi de exclusão de íons modelo Shim-pack SC-101H de 30 cm de comprimento e 7,9 mm de diâmetro, funcionando a 50 °C. A fase móvel foi uma solução de ácido perclórico com pH 2,1 e fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. A detecção do etanol e 1,2 propanodiol foi realizada por índice de refração (RID 10A) e a dos ácidos orgânicos, por radiação ultravioleta com comprimento de onda de 210 nm (UV – Vis/SPD - 10Ai).

2.2.5 Análise da microbiota das silagens

As amostras de 25 g de silagem foram diluídas assepticamente em 225 mL de água peptonada 0,1% estéril e agitadas em agitador orbital Tecnal – TE140, durante 20 minutos, a 120 rpm. O extrato obtido foi submetido a uma diluição decimal seriada até 10⁻⁶. A partir das diluições, alíquotas de 0,1 mL

foram espalhadas, em triplicata, com o auxílio de alça de Drigalsk, nos meios de cultivos.

A quantificação de BAL foi feita em meio MRS acrescido de nistatina 0,4% e incubado, a 30 °C, por 48 horas. A contagem de leveduras e fungos filamentosos foi realizada no meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (HYMEDIA®) incubado a 30 °C, por 48 horas, para leveduras e 120 horas, para fungos filamentosos. Em caso de subjetividade na quantificação de leveduras e fungos filamentosos, as colônias foram diferenciadas observando-se suas características

2.2.6 Análise estatística

Os dados químico-bromatológicos, microbiológicos e metabólicos foram comparados por análise de variância (ANAVA) e suas médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o programa Sistema de Análise de Variância (SISVAR).

2.3 Avaliação da estabilidade aeróbica das silagens

Após 90 dias de ensilagem, as silagens foram expostas ao ar para análise da estabilidade aeróbica, que é definida como o tempo em que a temperatura da silagem permaneceu estável até aumentar mais que 2 °C acima da temperatura do ambiente (O'KIELY, 1993).

As silagens foram colocadas em recipientes e mantidas em sala com temperatura controlada. Na massa foi inserido um Data Logger's (Impac, modelo MI-IN-D-2-L), a 10 cm de profundidade, registrando a temperatura a cada 30 minutos, durante 7 dias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características da planta de milho

A planta de milho apresentou teor de MS de 366,55 g kg⁻¹ MF, valor superior ao recomendado por Filya (2004), que é entre 300 e 350 g kg⁻¹ e relatado no trabalho de Silva et al. (2014). O alto valor de matéria seca na planta de milho pode ser explicado pela data de plantio e colheita do milho que foi em época de estresse hídrico na região sul de Minas Gerais. Os teores de PB e CHO estão dentro do recomendado por Jaremtchuk et al. (2005), que são os mínimos de 70 e 60 g kg⁻¹ MS, respectivamente, contribuindo para a fermentação e a conservação adequada da silagem pelas BAL. O teor de FDN se encontra dentro do relatado na literatura (VASCONCELOS et al., 2005) e compatível com o trabalho de Almeida Filho et al. (1999) e Silva et al. (2014) (Tabela 1).

A contagem de bactérias lácticas e fungos da microbiota epífita diverge das encontrada nos trabalhos de Basso et al. (2012), Filya (2003), Filya, Sucu e Karabulut (2006) e Kung Junior e Shaver (2001), porém, está próxima das encontradas nos trabalhos de Addah et al. (2011) e Silva et al. (2014) (Tabela 1).

O conteúdo metabólico presente na forragem foi semelhante aos encontrados na literatura, com exceção do etanol, que se apresentou acima do encontrado na literatura (ASSIS et al., 2014; KROONEMAN et al., 2002) (Tabela 1).

Tabela 1 Características químico-bromatológicas, microbiológicas e produção de metabólitos da planta de milho

Variável	Forragem
Matéria seca (g kg^{-1} MF)	366,55
pH	5,46
<i>Teores em g kg^{-1} MS</i>	
Carboidratos solúveis	90,26
Fibra em detergente neutro	594,25
Proteína bruta	69,21
<i>Populações em $\log \text{UFC g}^{-1}$</i>	
Bactérias do ácido láctico	5,95
Leveduras	6,02
Fungos filamentosos	9,87
<i>Concentrações em g kg^{-1} MS</i>	
Ácido láctico	14,75
Ácido acético	2,82
Ácido propiônico	1,35
Ácido butírico	0,15
Etanol	13,92
1,2 propanodiol	0

3.2 Perfil fermentativo das silagens

Os teores de FDN foram influenciados pela inoculação do *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 ($p < 0,05$) e o tempo de fermentação ($p < 0,05$), porém, a interação entre esses fatores não foi verificada ($p > 0,05$). Para os teores de MS e perdas por efluente houve efeito apenas do tempo de fermentação ($p < 0,05$). Os teores de PB não foram influenciados por nenhum dos fatores estudados ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 Probabilidade do efeito (*P*) dos fatores silagem e tempo de fermentação na composição das silagens de milho

Variável	<i>P</i>		
	Silagem	Tempo	Interação
pH	>0,05	<0,05	<0,05
Matéria seca (g kg ⁻¹ MF)	>0,05	<0,05	>0,05
Perdas por efluente (%)	>0,05	<0,05	>0,05
<i>Teores em g kg⁻¹ MS</i>			
Carboidratos solúveis em água	<0,05	<0,05	<0,05
Fibra em detergente neutro	<0,05	<0,05	>0,05
Proteína bruta	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Populações em log UFC g⁻¹</i>			
Bactérias do ácido láctico	>0,05	<0,05	<0,05
Leveduras	<0,05	<0,05	<0,05
Fungos filamentosos	<0,05	<0,05	<0,05
<i>Concentrações em g kg⁻¹ MS</i>			
Ácido láctico	<0,05	<0,05	>0,05
Ácido acético	<0,05	<0,05	<0,05
Ácido propiônico	>0,05	<0,05	>0,05
Ácido butírico	>0,05	<0,05	>0,05
Etanol	<0,05	<0,05	<0,05
1,2 propanodiol	<0,05	<0,05	<0,05

O teor médio de FDN, em todos os tempos de abertura nas silagens controle, foi de 594,44 g kg⁻¹ MS, diferindo significativamente ($p < 0,05$) do teor médio das silagens inoculadas, de 577,78 g kg⁻¹ MS (Gráfico 1). Essa diferença mostra que, possivelmente, o inoculante reduziu as perdas de MS e conservou mais CHO e, proporcionalmente, a FDN ficou mais baixa na silagem inoculada.

Com relação às mudanças temporais, o teor de FDN médio de 594, 25 g kg⁻¹ MS na forragem aumentou para 610,02 g kg⁻¹ MS, com 10 dias de fermentação. Contudo, este aumento não foi significativo ($p > 0,05$), assim como o decréscimo da FDN, aos 60 dias de fermentação, para 579, 24 g kg⁻¹ MS, ao final do processo de ensilagem, apresentou redução significativa ($p < 0,05$), atingindo 559,92 g kg⁻¹ MS (Gráfico 1).

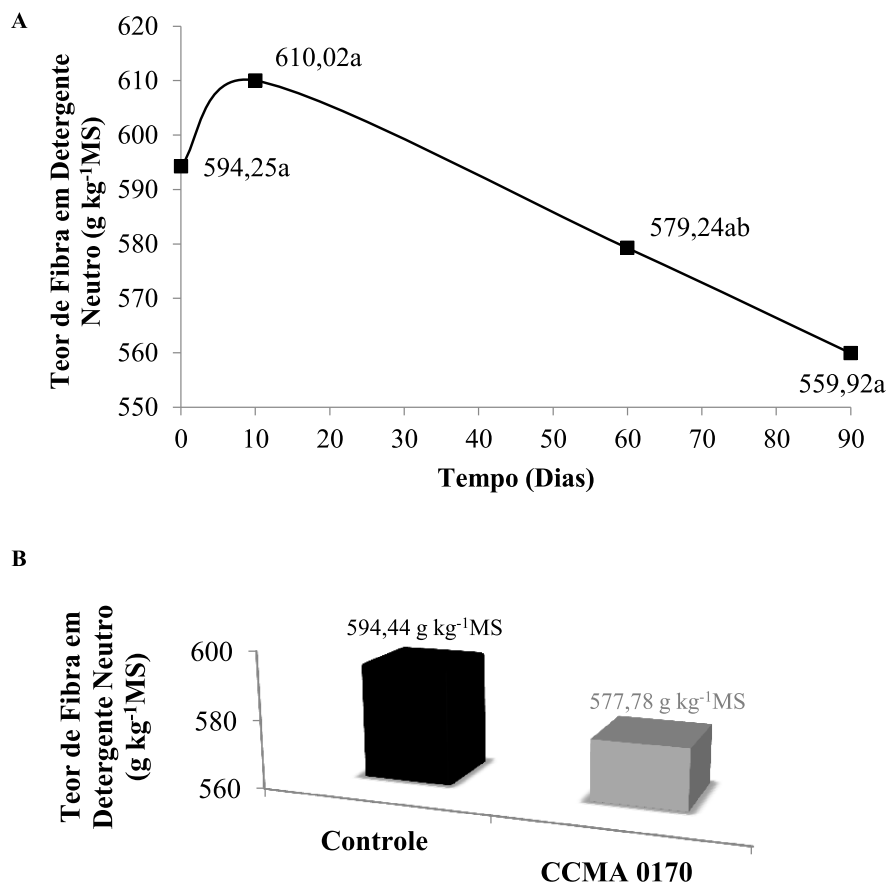


Gráfico 1 Teores de fibra em detergente neutro. Figura A: Teores médios no decorrer do processo fermentativo. Figura B: Teores médios nas silagens inoculadas e controles

O aumento na fração de FDN pode ser devido ao consumo de CNF pela respiração celular, na primeira fase do processo de ensilagem, e por microrganismos, durante a fase de fermentação, fazendo com que ocorra concentração dos componentes fibrosos em relação à MS total, levando a esse aumento numérico no teor de fibras presentes nas silagens (ÁVILA et al., 2008). A redução dos teores de FDN pode ser explicada pela degradação da

hemicelulose por ação enzimática da própria planta ou devido à ação ácida, já que as silagens que apresentaram menor pH foram aquelas que também apresentaram menores frações de FDN. Tal fato pode ser positivo devido ao fato de a hidrólise das fibras fornecer quantidades extras de carboidratos solúveis aos microrganismos, proporcionando maior queda de pH e conservação da forragem, além de aumentar a digestibilidade e o consumo do alimento (CUMMINS et al., 2007; JONES; HATFIELD; MUCK, 1992).

Com o processo fermentativo, o teor de MS na forragem ($366,55 \text{ g kg}^{-1}$) aumentou aos 10 dias de fermentação ($378,79 \text{ g kg}^{-1}$) e, a partir dos 60 dias, decaiu ($377,35 \text{ g kg}^{-1}$) e atingiu $362,20 \text{ g kg}^{-1}$, no final da fermentação. Contudo, essas variações na MS não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) (Gráfico 2). A redução no teor de MS foi menor que as encontradas em trabalhos com cepas heterofermentativas (FILYA; SUCU, 2010; JATKAUSKAS; VROTNIAKIENE, 2005; WITTENBERG; INGALLS; DEVLIN, 1983), porém, próxima à encontrada por Oliveira et al. (2010).

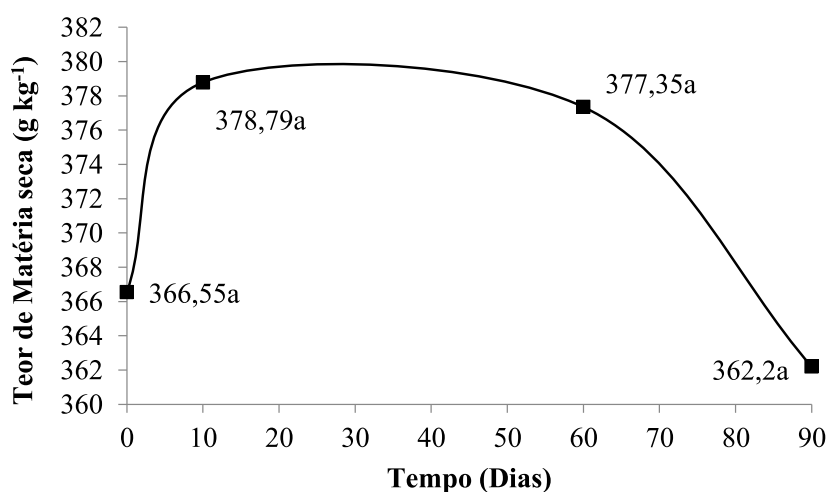


Gráfico 2 Teores médios de matéria seca no decorrer do processo fermentativo

As perdas de MS por efluente aumentaram significativamente ($p < 0,05$) até os 10 dias de fermentação, atingindo 0,88% e estabilizando-se. Aos 90 dias de fermentação, alcançou 1,23% (Gráfico 3). A perda de MS é prejudicial à qualidade da silagem, contudo, a MS, no momento da ensilagem, estando até 35%, minimiza as perdas, mantendo as concentrações necessárias dos nutrientes durante o processo fermentativo (KUNG JUNIOR; SHAVER, 2001). Os valores encontrados neste trabalho são inferiores aos relatados por Assis et al. (2014), que testaram cepas distintas para inoculante microbiano de silagem de milho.

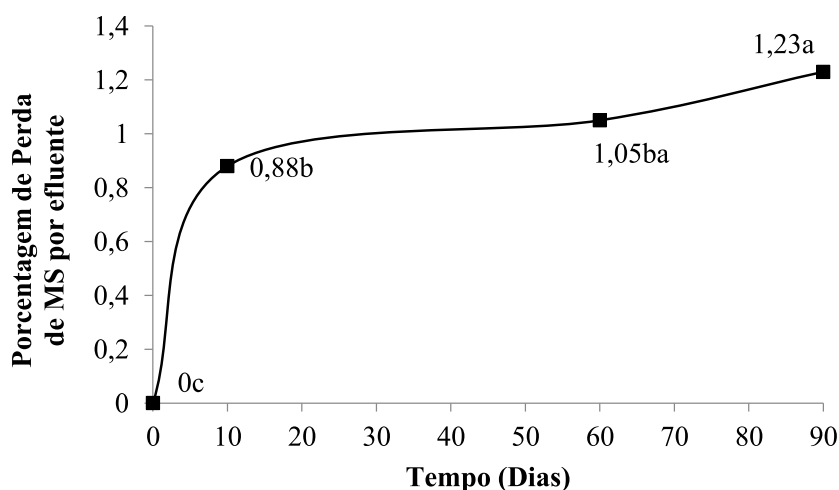


Gráfico 3 Porcentagens médias de perda de matéria seca por efluente no decorrer do processo fermentativo

Os teores de CHO e valores de pH foram influenciados pela interação significativa entre os fatores inoculante e tempo de fermentação ($P < 0,05$) (TABELA 2).

Os carboidratos solúveis são substratos essenciais para o crescimento de BAL que, ao hidrolisarem os açúcares liberando ácidos orgânicos, principalmente lático e acético, reduzem o pH da massa (CHEN et al., 2013). O

teor de CHO na silagem inoculada reduziu mais lentamente que na silagem controle, decaindo significativamente ($p < 0,05$) de $96,69 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ para $28,13 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, aos 10 dias de fermentação, estabilizando até os 60 dias ($27,97 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$) e reduzindo significativamente ($p < 0,05$) para $4,69 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, no final da fermentação. A silagem controle decaiu significativamente ($p < 0,05$) aos 10 dias de fermentação, para $18,78 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ e, aos 60 dias, atingiu $2,05 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, estabilizando-se e chegando a $1,94 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, no final do processo fermentativo. As silagens inoculadas com o *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 apresentaram menor redução dos CHO e valores próximos ao encontrado por Filya e Sucu (2010), diferindo significativamente da silagem controle, a partir de 60 dias de fermentação ($p < 0,05$) (Gráfico 4).

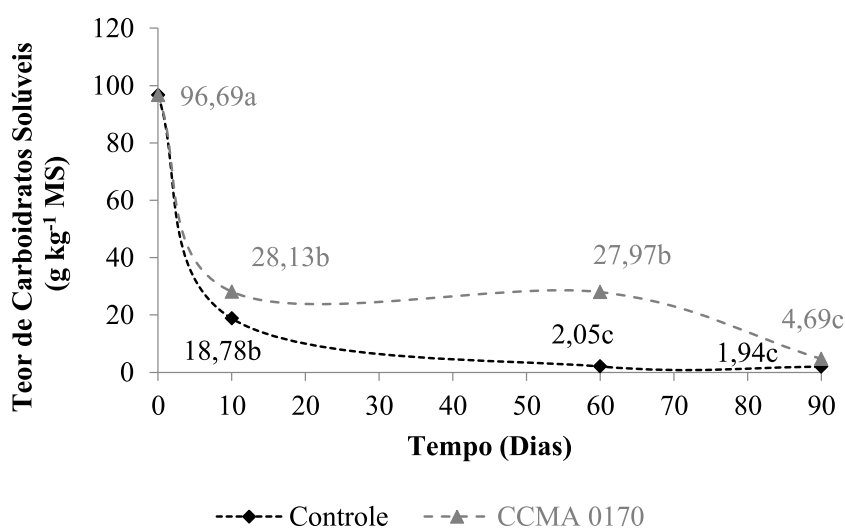


Gráfico 4 Teores de carboidratos solúveis nas silagens controle e inoculada, no decorrer do processo fermentativo

O valor do pH teve redução significativa ($p < 0,05$) após 10 dias de fermentação, tanto para silagem controle quanto para inoculada, partindo de 5,46

e atingindo 3,88 e 3,99, respectivamente. Com 60 dias de fermentação, a silagem inoculada decaiu significativamente ($p < 0,05$) para 3,85, estabilizando-se e atingindo 3,75, aos 90 dias de fermentação. A silagem controle estabilizou-se dos 10 dias de fermentação até o final do processo, chegando a 3,84 (Gráfico 5). É importante salientar que os valores de pH foram significativamente diferentes ao final do processo fermentativo ($p < 0,05$) e o pH mais ácido da silagem inoculada foi obtido consumindo-se menos carboidratos solúveis durante a ensilagem, destacando a eficiência da cepa inoculada e o baixo poder tampão da planta de milho. O valor de pH está dentro da faixa ideal de inibição de microrganismos deterioradores e característico de silagem de milho que, de acordo com Kleinschmit e Kung Junior (2006) e Moisis e Heikonen (1994) é de, no máximo, 4,2.

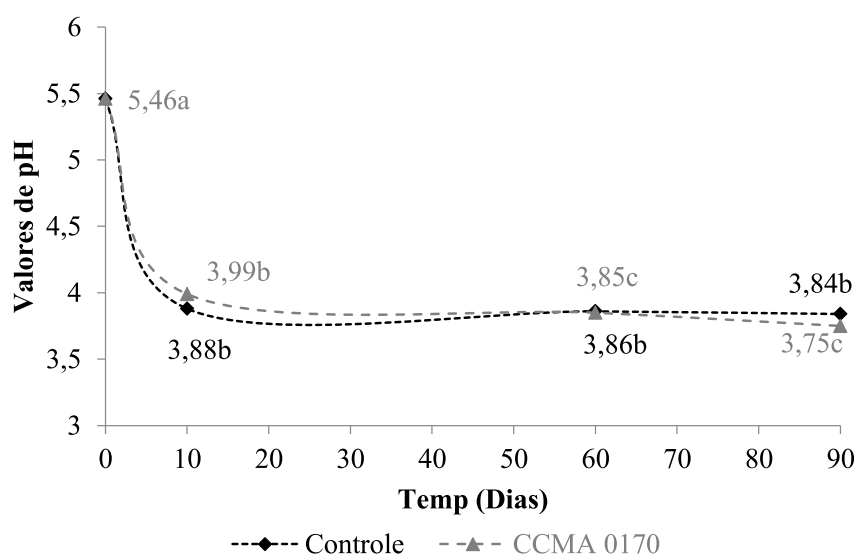


Gráfico 5 Valores de pH no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada

As populações de BAL, leveduras e fungos filamentosos foram influenciadas pela interação entre o tempo de fermentação e a aplicação ou não do *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 ($p < 0,05$) (TABELA 2).

A população de bactéria láctica nas silagens controle e inoculada não diferiu estatisticamente ($p>0,05$), em nenhum momento do processo fermentativo e aumentaram significativamente ($p<0,05$) apenas com 60 dias de fermentação, atingindo 8,44 e 8,61 log UFC g⁻¹, respectivamente, estabilizando-se e chegando aos 90 dias de fermentação, com 8,58 e 8,60 log UFC g⁻¹, respectivamente. A população final foi maior que a encontrada no trabalho de Silva et al. (2014) e próxima à do trabalho de Addah et al. (2011) (GRÁFICO 6). Diferente dos trabalhos de Assis et al. (2014), Li e Nishino (2011) e Santos, Ávila e Schwan (2013), a população de BAL, tanto nas silagens controle quanto na inoculada, não reduziu com 60 dias de fermentação, aumentou significativamente ($p>0,05$) e manteve-se estável até o final do processo fermentativo, provavelmente por detrimento de substrato ou de compostos tóxicos ao crescimento presentes na silagem.

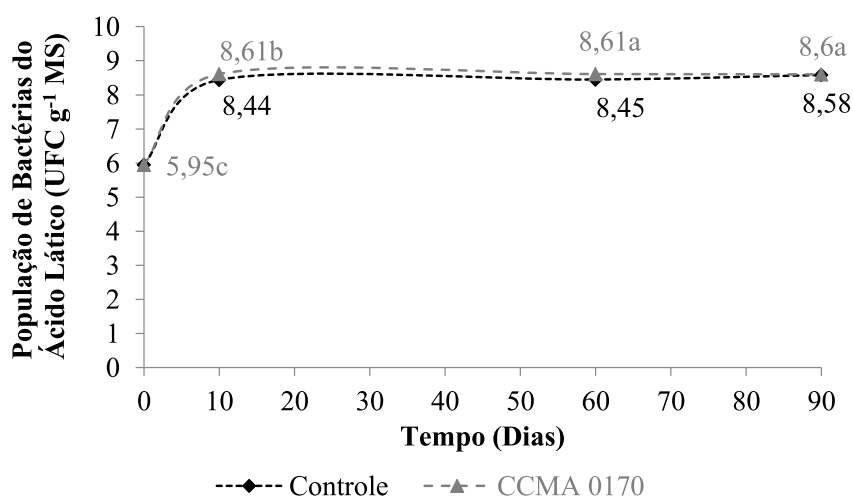


Gráfico 6 População de bactérias do ácido láctico no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada

As populações de leveduras e fungos filamentosos reduziram significativamente ($p < 0,05$) nas silagens inoculadas e controle. Nas silagens controle, as populações de leveduras e de fungos filamentosos atingiram 3,18 e 7,85 log UFC g⁻¹, respectivamente. Nas silagens inoculadas, ambos apresentaram valores menores que o mínimo detectável de 2 log UFC g⁻¹, após o processo de ensilagem (Gráficos 7 e 8). A diferença entre as populações de leveduras e fungos filamentosos, após 90 dias de fermentação nas silagens inoculadas e controles, foi significativa ($p < 0,05$) e benéfica, mostrando que a concentração de ácidos orgânicos nas silagens com adição de inoculante foi superior às concentrações mínimas inibitórias (CMI) ao crescimento desses microrganismos deterioradores (LI; NISHINO, 2011). A concentração mínima inibitória dos ácidos orgânicos pode ter sido atingida devido ao efeito sinérgico dos ácidos láctico, acético e propiônico muito comum no processo de ensilagem, e acentuado em silagens inoculadas com cepas microbianas produtoras desses ácidos na ensilagem (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK, 2000; MOON, 1983).

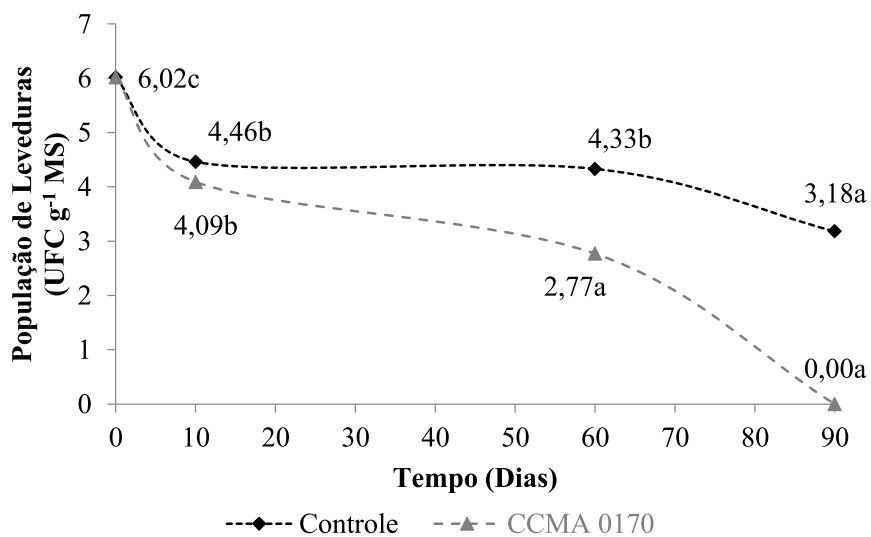


Gráfico 7 População de leveduras no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada

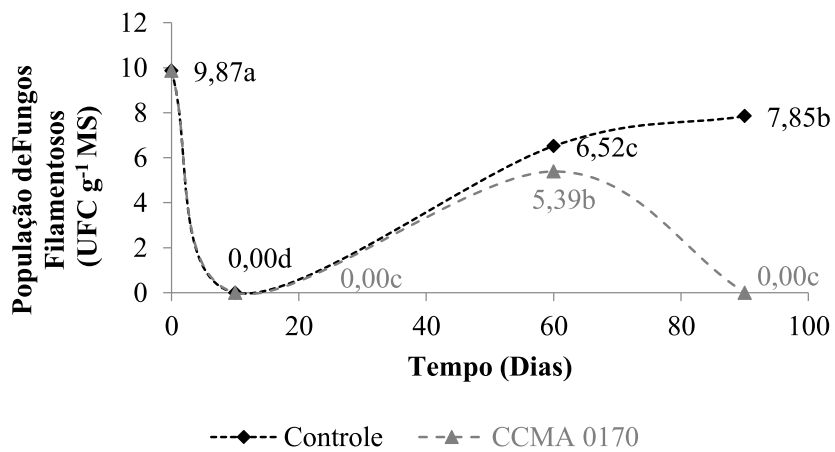


Gráfico 8 População de fungos filamentosos no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada

A concentração de ácido láctico foi influenciada pela inoculação do *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 ($p < 0,05$) e pelo tempo de fermentação ($p < 0,05$). Houve interação significativa entre os fatores estudados para as concentrações de ácido acético, etanol e 1,2 propanodiol ($p < 0,05$). As concentrações dos ácidos propiônico e butírico foram influenciadas pelo processo de fermentação ($p < 0,05$) (Tabela 2).

A concentração do ácido láctico, independente dos tempos de abertura, nas silagens controle, foi de $49,33 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, diferindo significativamente ($p < 0,5$) da silagem inoculada, que apresentou concentração de $59,85 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ (Gráfico 9). Considerando os tempos de abertura durante a ensilagem, a concentração do lactato na forragem foi de $14,75 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, aumentando significativamente ($P < 0,05$) para $61,98 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, aos 10 dias de fermentação e estabilizando-se até o final do processo, quando atingiu $72,46 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ (Gráfico 9). Até 10 dias de fermentação ocorreu intensa produção de ácido láctico e, a partir deste ponto, houve aumento da concentração, porém, não mais significativa. Tal fato pode ser justificado pela queda dos carboidratos solúveis com o decorrer da fermentação e, ainda, pela utilização do lactato por outros microrganismos nos estágios finais de ensilagem, antes inibidos (KUNG JUNIOR; SHAVER, 2001).

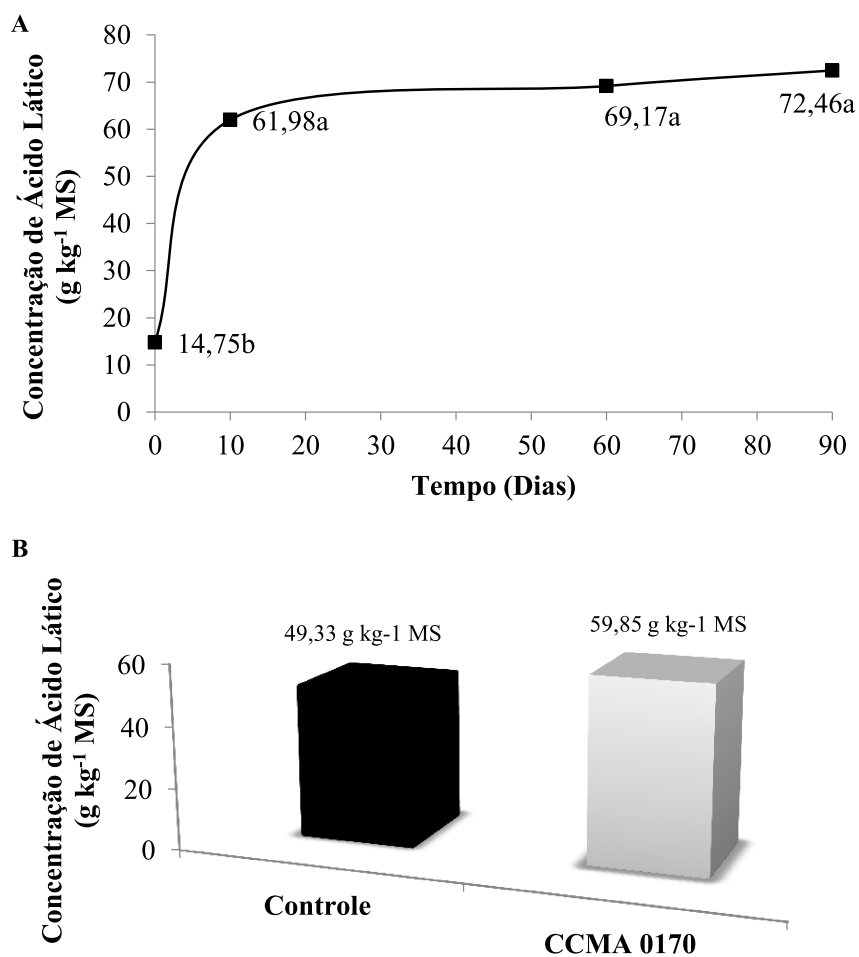


Gráfico 9 Concentrações de ácido lático. Figura A: Concentrações médias de ácido lático no decorrer do processo fermentativo. Figura B: Concentrações médias de ácido lático nas silagens controle e inoculada

As concentrações encontradas são superiores às de muitos trabalhos encontrados na literatura, inclusive em estudos de seleção de novas cepas para

inoculantes e combinações de espécies (ASSIS et al., 2014; BASSO et al., 2012; JATKAUSKAS; VROTNIAKIENE, 2005, 2011; KELES; DEMIRCI, 2011; LI; NISHINO, 2011; NISHINO et al., 2003; REICH; KUNG JUNIOR, 2010; SANTOS; ÁVILA; SCHWAN, 2013; SILVA et al., 2014). Entretanto, os trabalhos de Addah et al. (2011) e Nkosi et al. (2012), que estudaram o efeito de uma mistura comercial e das espécies *L. buchneri* e *L. plantarum*, respectivamente, apresentaram valores superiores, porém, não muito distantes dos encontrados neste estudo. As concentrações de ácido láctico encontradas neste estudo sugerem que esta espécie de lactobacilos apresenta grande potencial para inoculante microbiológico para milho com alto teor de MS.

A concentração de ácido acético aumentou significativamente ($p < 0,05$) até os 10 dias de fermentação na silagem inoculada e controle, chegando a 9,02 e 4,16 g kg⁻¹ MS, respectivamente. A partir dos 10 dias até o final do processo fermentativo, a concentração de acetato estabilizou-se e atingiu 12,93 g kg⁻¹ MS na silagem inoculada e 4,92 g kg⁻¹ MS na silagem controle. O valor encontrado na silagem inoculada foi superior ao relatado nos trabalhos de Assis et al. (2014), Santos, Ávila e Schwan (2013) e Silva et al. (2014), semelhante aos trabalhos de Addah et al. (2011) e Basso et al. (2012) e inferior aos resultados de Jatkauskas e Vrontniakiene (2005, 2011) e Nkosi et al. (2012). O teor de acetato nas silagens inoculadas foi significativamente ($p < 0,05$) menor que nas silagens controle a partir dos 10 dias de fermentação, mostrando que a cepa de *L. hilgardii* CCMA 0170 inoculada influenciou a produção do ácido. O *L. hilgardii* é heterofermentador e semelhante ao *L. buchneri*, portanto, apresenta capacidade de reduzir ácido láctico a ácido acético, etanol e 1,2 propanodiol (HEINL et al., 2012; KROONEMAN et al., 2002) (GRÁFICO 10).

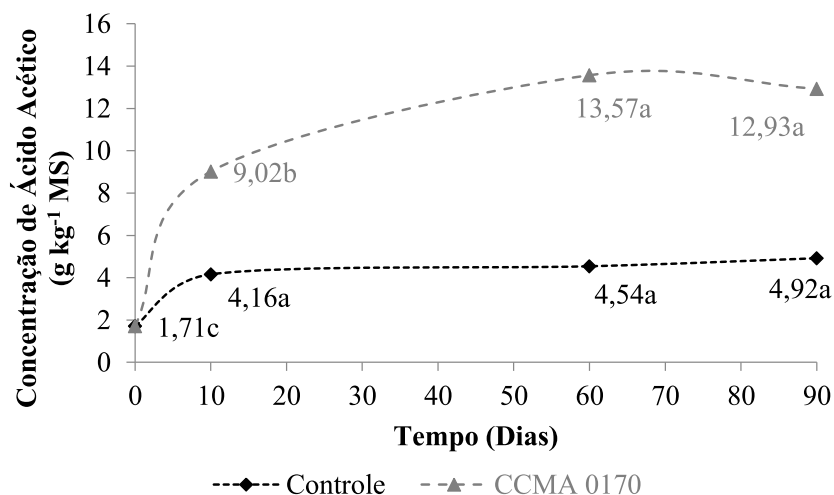


Gráfico 10 Concentrações de ácido acético no decorrer do processo fermentativo nas silagens controle e inoculada

Mesmo a concentração de etanol aumentando nas silagens inoculadas e controle, o aumento não foi significativo ($p > 0,05$) e não diferiu entre si ao final da ensilagem ($p > 0,05$) (Gráfico 11). A concentração final de etanol foi de 17,33 g kg⁻¹ MS, nas silagens com inoculante e 20,36 g kg⁻¹ MS, nas silagens controle, valores superiores aos encontrados por Li e Nishino (2011), Reich e Kung Junior (2010) e Tabacco et al. (2011) e inferiores aos de Santos, Ávila e Schwan (2013) que estudaram várias cepas para seleção de inoculante. Além da alta concentração de etanol na forragem, outro fator que pode ter ocasionado alta produção de etanol na ensilagem é o fato de *L. hilgardii* ser heterolático e ter como produto do seu metabolismo etanol (TABACCO et al., 2011). Apesar da alta concentração relatada, de acordo com Kung Junior e Shaver (2001), os teores de etanol se enquadram na faixa aceitável de 10 a 30 g kg⁻¹ MS.

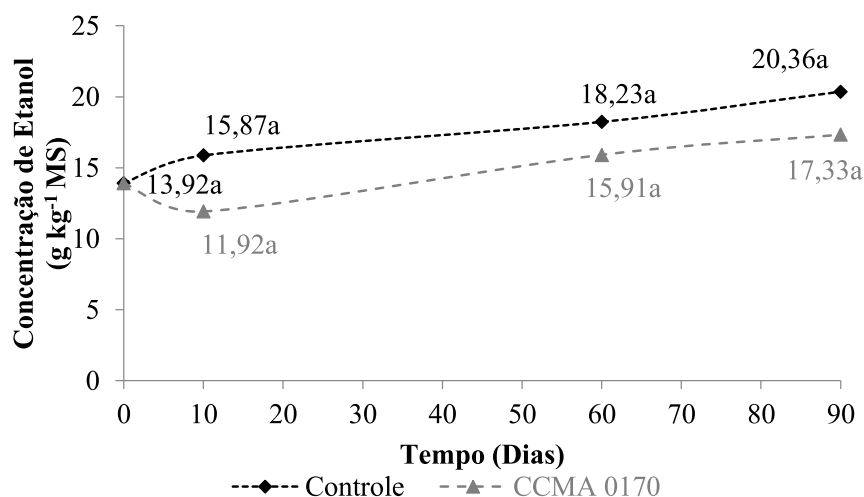


Gráfico 11 Concentrações de etanol no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada

A concentração de 1,2 propanodiol aumentou significativamente nas silagens inoculadas ($p < 0,05$) até os 10 dias de processo fermentativo, chegando a $0,0088 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ e estabilizando-se até os 90 dias de fermentação, quando atingiu $0,0127 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ (GRÁFICO 12). Nas silagens controle não foi observada a produção desse metabólito. Nos trabalhos de Assis et al. (2014), Li e Nishino (2011), Reich e Kung Junior (2010) e Silva et al. (2014) as concentrações desse metabólito foram superiores. Por outro lado, no trabalho de Santos, Ávila e Schwan (2013), elas foram inferiores. O 1,2 propanodiol é produto da quebra do ácido láctico, juntamente com o etanol e ácido acético, por bactérias heteroláticas, podendo ser metabolizado por algumas bactérias a 1-propanol e ácido propiônico (NISHINO et al., 2003; OUDE ELFERINK et al., 2001).

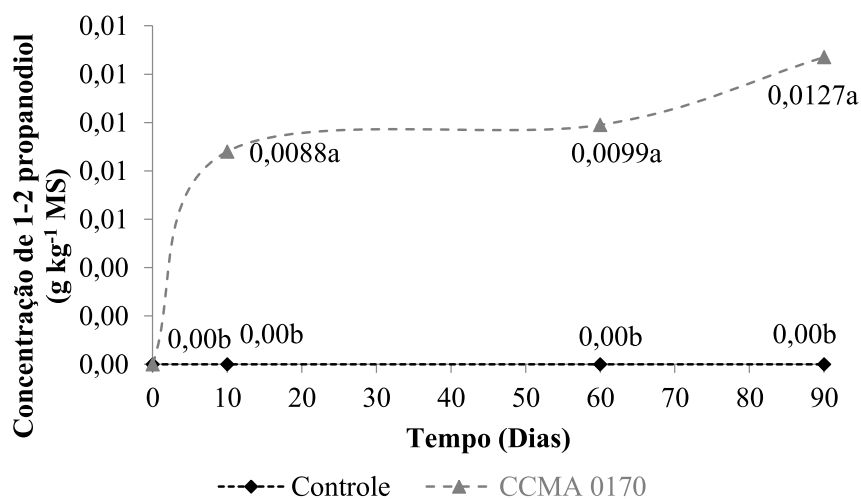


Gráfico 12 Concentrações de 1-2 propanodiol no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada

A concentração de ácido propiônico aumentou no decorrer do processo fermentativo, porém, não significativamente ($p > 0,05$), partindo do valor médio de $1,35 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ na forragem, alcançando $2,25 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ aos 10 dias de fermentação, $2,74 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ com 60 dias e atingindo $2,79 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ ao final da ensilagem (Gráfico 13). O resultado obtido é inferior ao encontrado no trabalho de Santos, Ávila e Schwan (2013), no qual foram estudadas várias cepas para a seleção de novos inoculantes. Contudo, nos trabalhos de Nkosi et al. (2012) e Silva et al. (2014) foram apresentadas concentrações inferiores. O ácido propiônico, juntamente com o ácido acético, tem efeito sinérgico, inibindo o crescimento de leveduras e de fungos filamentosos (LI; NISHINO, 2011).

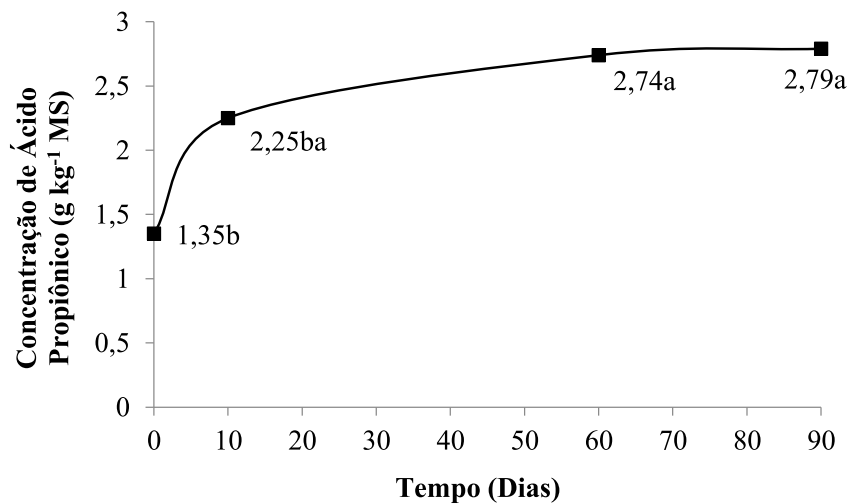


Gráfico 13 Concentrações de ácido propiônico no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada

O ácido butírico está relacionado à contaminação por clostrídios, atribuindo baixa palatabilidade ao alimento e sua recusa por parte do animal, sendo o limite aceitável em silagem no máximo 0,1 g kg⁻¹ MS (DEMARQUILLY, 1998; OUDE ELFERINK et al., 2001; ROSSI; DELLAGLIO, 2007). No presente trabalho, a concentração foi de 1,39 g kg⁻¹ MS (Gráfico 14). Mesmo a concentração sendo baixa, não está dentro do máximo aceito, o que implica em um ponto negativo.

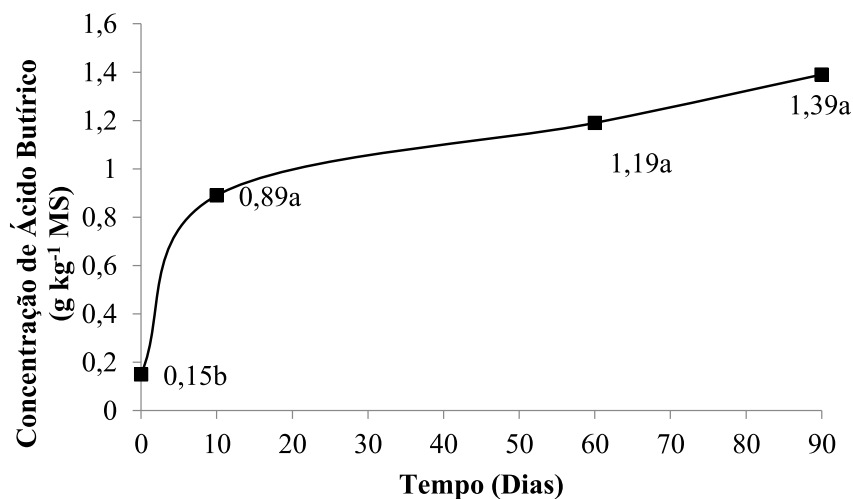


Gráfico 14 Concentrações de ácido butírico no decorrer do processo fermentativo, nas silagens controle e inoculada

3.3 Estabilidade aeróbica das silagens

O crescimento de microrganismos deterioradores nas silagens aumenta a temperatura da massa, portanto, aferir a temperatura das silagens é uma medida indireta de avaliar a deterioração na massa. A silagem permanece estável até que sua temperatura ultrapasse 2 °C acima da temperatura ambiente (TAYLOR; KUNG JÚNIOR, 2002).

As temperaturas da silagem inoculada com o *L. hilgardii* CCMA 0170 não apresentaram elevação durante todo o tempo exposto ao ar, sendo sempre mais baixas que a temperatura ambiente, ao contrário da silagem controle que, com três dias de exposição ao ar, apresentou 2 °C acima da temperatura ambiente. A silagem controle chegou a uma temperatura máxima de 29 °C, 8 °C acima da temperatura ambiente (Gráfico 15).

O fato de a silagem inoculada ter mantido a estabilidade durante os sete dias de avaliação pode ser atribuído ao fato de o *L. hilgardii* ser

heterofermentador e produzir ácidos acético e propiônico que inibem o crescimento de fungos filamentos e leveduras, os maiores deterioradores aeróbios de silagens. Trabalhos em que foram utilizadas cepas heterofermentativas, sozinhas ou combinadas, apresentaram período de estabilidade maior que o obtido neste trabalho (JATKAUSKAS; VROTNIAKIENE, 2011; REICH; KUNG JUNIOR, 2010).

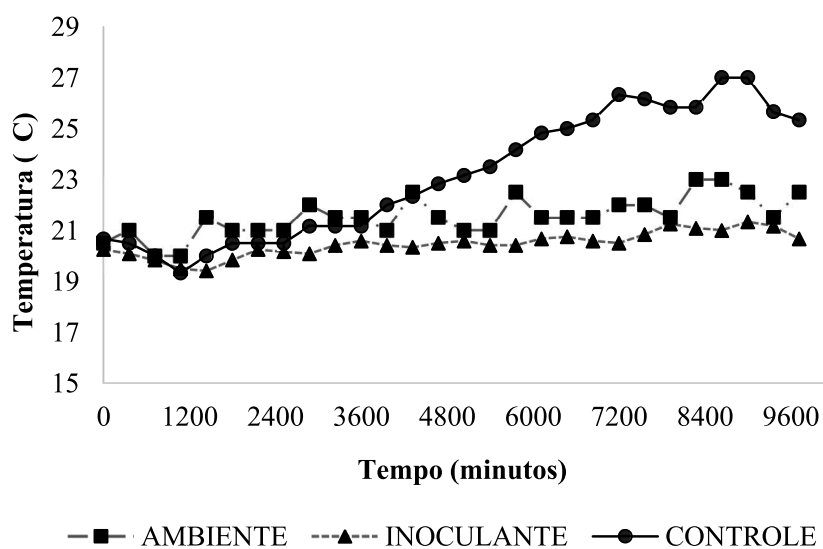


Gráfico 15 Variação da temperatura durante a exposição aeróbica das silagens controle e inoculada

A população média ao final do período de exposição aeróbica, nas silagens controle e inoculada, de BAL, foi de $7,18 \log \text{UFC g}^{-1}$ e $7,63 \log \text{UFC g}^{-1}$; de levedura, de $5,6 \log \text{UFC g}^{-1}$ e $1,06 \log \text{UFC g}^{-1}$ e de fungos filamentos, de $4,83 \log \text{UFC g}^{-1}$ e $1,12 \log \text{UFC g}^{-1}$, respectivamente (Gráfico 16). Esses resultados apontam que a silagem inoculada, mesmo apresentando população próxima à do controle, possuía microrganismos capazes de produzir metabólitos

inibidores de leveduras e fungos filamentosos, proporcionando maior estabilidade aeróbica à silagem.

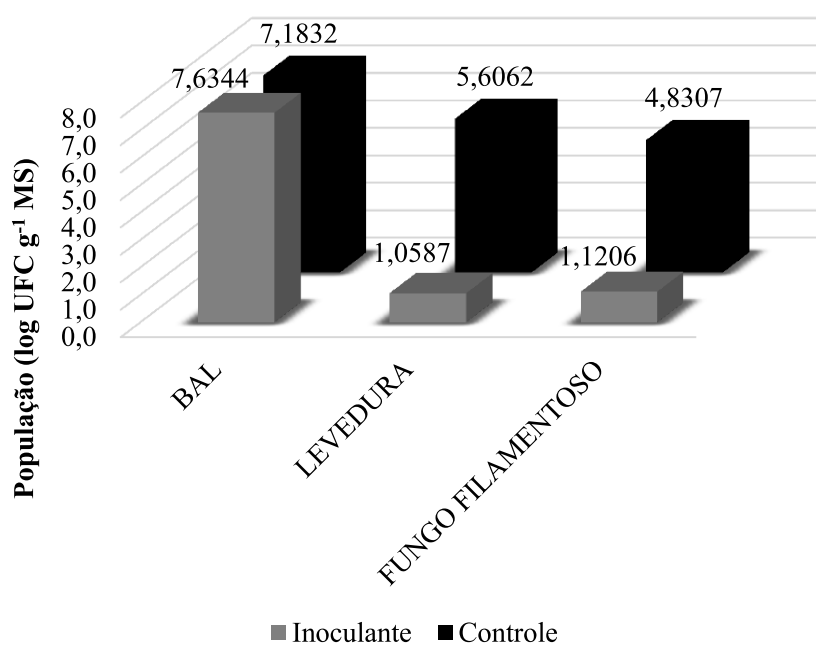


Gráfico 16 População de BAL, levedura e fungos filamentosos nas silagens inoculada e controle, após sete dias de exposição ao ar

4 CONCLUSÃO

A inoculação do *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 melhorou a qualidade da silagem de milho com baixa umidade, devido ao menor metabolismo de carboidratos solúveis para atingir um pH mais ácido que na silagem controle. Além da produção de ácido acético e propiônico, que sinergicamente contribuíram para a inibição de leveduras e fungos filamentosos, proporcionando maior estabilidade aeróbica que nas silagens controle, ocorreu alta liberação de ácido lático, colaborando para a acidez.

O *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170, isolado de silagem de cana-de-açúcar, apresenta as qualidades básicas para um bom inoculante microbiológico para a silagem de milho, sendo necessários mais estudos para avaliar sua performance em outros tipos de forragem.

REFERÊNCIAS

- ADDAH, W. et al. Comparison of the fermentation characteristics, aerobic stability and nutritive value of barley and corn silages ensiled with or without a mixed bacterial inoculant. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 91, n. 1, p. 133-146, Mar. 2011.
- ALMEIDA FILHO, S. L. de et al. Características agronômicas de cultivares de milho (*Zea mays* L.) e qualidade dos componentes e silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 28, n. 1, p. 7-13, jan./fev. 1999.
- ARAGÓN, Y. A.; JATKAUSKAS, J.; VROTNIAKIENĖ, V. The effect of a silage inoculant on silage quality, aerobic stability, and meat production on farm scale. **ISRN Veterinary Science**, Cairo, v. 2012, p. 1-6, Jan. 2012.
- ASSIS, F. G. do V. de et al. New inoculants on maize silage fermentation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 43, n. 8, p. 395-403, 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1.
- ÁVILA, C. L. da S. et al. Estabilidade aeróbia de silagens de capim-mombaça tratadas com *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 5, p. 779-787, 2009.
- ÁVILA, C. L. da S. et al. Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 255-261, nov. 2008.
- ÁVILA, C. L. da S. et al. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 2, p. 940-951, Feb. 2014.
- BASSO, F. C. et al. Short communication fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 41, n. 7, p. 1789-1794, 2012.

CARVALHO, B. F. et al. Aerobic stability of sugar-cane silage inoculated with tropical strains of lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, Mar. 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gfs.12117/abstract>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

CHEN, M. M. et al. Characteristics of lactic acid bacteria isolates and their inoculating effects on the silage fermentation at high temperature. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 71-78, Jan. 2013.

CHERNEY, J. H.; CHERNEY, D. J. Assessing silage quality. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R.; HARRISON, J. (Ed.). **Silages science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 141-198.

CUMMINS, B. et al. Conservation characteristics of grass and dry sugar beet pulp co-ensiled after different degrees of mixing. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, Dublin, v. 48, n. 2, p. 181-193, Dec. 2007.

DEMARQUILLY, C. Ensilage et contamination du lait par les spores butyriques. **INRA Productions Animales**, Paris, v. 11, n. 5, p. 359-364, 1998.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **The Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 22, n. 4, p. 212-216, 2000.

DUARTE, W. F. et al. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 36, n. 4, p. 557-569, Apr. 2009.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, Mar. 1956.

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

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

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

FILYA, L. Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 116, n. 1/2, p. 141-150, 2004.

FUSSELL, R. J.; MCCALLEY, D. V. Determination of volatile fatty acids (CrC5) and lactic acid in silage by gas chromatography. **Analyst**, London, v. 112, p. 1213-1216, 1987.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 6, p. 480-487, 2010.

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

JALČ, D. et al. Bacterial inoculant effects on corn silage fermentation and nutrient composition. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 22, n. 7, p. 977-983, 2009.

JAREMTCHUK, A. R. et al. Características agronômicas e bromatológicas de vinte genótipos de milho (*Zea mays* L.) para silagem na região leste paranaense. **Acta Scientiarum. Animal Science**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 181-188, 2005.

JATKAUSKAS, J.; VROTNIAKIENE, V. The effects of silage inoculants on the fermentation and aerobic stability of legume-grass silage. **Žemdirbystė-Agriculture**, Vilnius, v. 98, n. 4, p. 367-374, 2011.

JATKAUSKAS, J.; VROTNIAKIENE, V. Performance of dairy cows fed with high moisture whole plant maize silage inoculated with *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum*. **Archiva Zootechnica**, Balotesti, v. 8, p. 57-64, 2005.

JONES, B. A.; HATFIELD, R. D.; MUCK, R. E. Effect of fermentation and bacterial inoculation on lucerne cell walls. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, London, v. 60, n. 2, p. 147-153, 1992.

KELES, G.; DEMIRCI, U. The effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale-Hungarian vetch silage and lamb performance. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 164, n. 1/2, p. 21-28, Feb. 2011.

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

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

KUNG JUNIOR, L.; SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. **Focus on Forage**, Wisconsin, v. 3, n. 13, p. 1-5, 2001.

LI, Y.; NISHINO, N. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 110, n. 6, p. 1561-1570, June 2011.

MOISIO, T.; HEIKONEN, M. Lactic acid fermentation in silage preserved with formic acid. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 107-124, 1994.

MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 454-460, 1983.

MUGLALI, O. H. et al. The effect of a Lactic Acid Bacteria inoculant on corn silage ensiled at the different stages of vegetation. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 5, n. 2, p. 41-45, 2012.

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

NKOSI, B. D. et al. Effects of bacterial inoculants and an enzyme on the fermentation quality and aerobic stability of ensiled whole-crop sweet sorghum. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 42, n. 3, p. 232-240, 2012.

O'KIELY, P. Influence of a partially neutralised blend of aliphatic organic acids on fermentation, effluent production and aerobic stability of autumn grass silage. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, Dublin, v. 32, n. 1, p. 13-26, 1993.

OLIVEIRA, L. B. de et al. Perdas e valor nutritivo de silagens de milho, sorgo-sudão, sorgo forrageiro e girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 1, p. 61-67, 2010.

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

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 9, p. 1063-1073, Sept. 1993.

REICH, L. J.; KUNG JUNIOR, L. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 159, n. 3/4, p. 105-109, Aug. 2010.

ROSSI, F.; DELLAGLIO, F. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 5, p. 1707-1715, Nov. 2007.

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

SANTOS, A. O.; ÁVILA, C. L. S.; SCHWAN, R. F. Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 12, p. 7777-7789, Dec. 2013.

SILVA, N. C. S. A. et al. Evaluation of the effects of two *Lactobacillus buchneri* strains and sodium benzoate on the characteristics of corn silage in a hot-climate environment. **Grassland Science**, Hoboken, v. 60, p. 169-177, June 2014.

TABACCO, E. et al. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 11, p. 5589-5598, Nov. 2011.

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

VASCONCELOS, R. C. de et al. Efeito da altura de corte das plantas na produtividade de matériaseca e em características bromatológicas da forragem de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez. 2005.

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

ZHANG, T. et al. Effects of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 965-971, Feb. 2009.

ZOPOLLATTO, M. et al. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, p. 170-189, jul. 2009. Número especial.

ARTIGO 2

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 NAS
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DA
SILAGEM DE CANA-DE-ACÚCAR (*Saccharum spp.*)**

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) tem características favoráveis para a produção de silagem de boa qualidade, no entanto, há alta produção de etanol. Estudos iniciais apontam que *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 tem aparente capacidade para inoculante microbiano. Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com esquema fatorial tipo 3(doses do inoculante) x 4(tempo de abertura), com 4 repetições. A população viável de *L. hilgardii* CCMA 0170 inoculada foi de 5 e 6 log UFC g⁻¹ de forragem. Foram avaliados os teores de MS, CHO, FDN, PB, os valores de pH, as populações de BAL, leveduras e fungos filamentosos, as concentrações de ácido láctico, acético e propiônico, etanol e 1,2 propanodiol. O teor de MS na cana-de-açúcar foi de 384,93 g kg⁻¹; de CHO, 160,82 g kg⁻¹ MS; as frações de FDN foram de 523,32 g kg⁻¹ MS; PB apresentou teor de 31,97 g kg⁻¹ MS e o pH da forragem estava em 6,32. A contagem da microbiota epífita foi de 5 log UFC g⁻¹ de BAL, 5,38 log UFC g⁻¹ de leveduras e 5,04 log UFC g⁻¹ de fungos filamentosos. Não foram encontradas concentrações de ácidos láctico, acético e propiônico, etanol e 1,2 propanodiol. O teor de CHO na silagem controle reduziu 67,06%, na silagem inoculada com 5 log UFC g⁻¹ 63,82% e, na silagem com 6 log UFC g⁻¹ ao teor de CHO, a redução foi de 55,52%. Os valores de pH atingiram 3,56. O teor de MS na silagem controle alcançou 315,45 g kg⁻¹ MS e, nas silagens inoculadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹, chegaram a 378,88 e 381,56 g kg⁻¹, respectivamente. As frações de FDN na silagem controle alcançaram 713,03 g kg⁻¹ MS e, nas silagens inoculadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹, alcançaram 594,38 e 598,66 g kg⁻¹ MS. A porcentagem de perda de MS na silagem controle chegou a 29,51%; a 5 log UFC g⁻¹ chegou a 0,85% e a 6 log UFC g⁻¹, 11,31%. A silagem controle, inoculada com 5 e com 6 log UFC g⁻¹ apresentou, respectivamente, 9,16, 9,54 e 9,53 log UFC g⁻¹ de BAL. A população de leveduras na silagem controle reduziu para 4,34 log UFC g⁻¹, enquanto na silagem inoculada com 5 e 6 log UFC g⁻¹ de BAL atingiu 2,07 log UFC g⁻¹. A população de fungo filamentoso chegou a zero. A concentração de ácido láctico, independente da inoculação, chegou a 48,62 g kg⁻¹ MS. A concentração de ácido acético na silagem controle atingiu 2,89 g kg⁻¹ MS e, nas silagens inoculadas, 13,51 g kg⁻¹ MS (5 log UFC g⁻¹) e 10,53 g kg⁻¹ MS (6 log UFC g⁻¹). A silagem controle atingiu a concentração máxima de 0,44 g kg⁻¹ MS de ácido propiônico e nas silagens inoculadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹ de BAL, de 1,04 e 3,15 g kg⁻¹ MS, respectivamente. O 1,2 propanodiol não foi detectado na silagem controle e nas silagens tratadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹ de BAL as concentrações foram de 0,006 e 0,005 g kg⁻¹ MS, respectivamente. A concentração de etanol na silagem controle atingiu 90,02 g kg⁻¹ MS e na silagem inoculada, 25,19 g kg⁻¹ MS (5 log UFC g⁻¹) e 5,69 g kg⁻¹ MS (6 log UFC g⁻¹). A inoculação do *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 melhorou a qualidade das

silagens de cana-de-açúcar, independente das doses aplicadas, principalmente pela menor concentração de etanol.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, *Lactobacillus hilgardii*, leveduras.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) tem diversas características favoráveis para a produção de silagem de boa qualidade, dentre elas o alto teor de carboidratos solúveis (CHO), o baixo poder tampão e o teor de matéria seca (MS) adequado (ÁVILA et al., 2014; CARVALHO et al., 2014b). No entanto, a alta concentração de CHO, principalmente a sacarose, favorece a atividade fermentativa de leveduras, resultando na produção de altas concentrações de etanol que diminuem a palatabilidade da silagem, além de competir com as bactérias do ácido lático (BAL) por substrato e desencadearem perdas de MS e aumento do pH (PEDROSO et al., 2011; SCHMIDT et al., 2014).

As leveduras conseguem sobreviver em baixa concentração de oxigênio e pH ácido, conferindo vantagens para que dominem o processo fermentativo. Na tentativa de controlar a população de leveduras é apontado o uso de inoculantes microbianos para o aumento da população de BAL competitiva, produzindo metabólitos benéficos à silagem (PEDROSO et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2010).

O *Lactobacillus hilgardii* é heterofermentador obrigatório e pouco se sabe sobre sua aplicação na conservação de forragens. Contudo, desde o isolamento da cepa CCMA 0170 a partir de silagem de cana-de-açúcar por Ávila et al. (2012), estudos iniciais estão sendo feitos em silagens de cana-de-açúcar, por Ávila et al. (2014) e Carvalho et al. (2014a, 2014b) e de milho, por Assis et al. (2014). Os resultados apontam que esta cepa tem aparente capacidade para inoculante microbiano, visto que as silagens apresentaram maiores teores de ácidos acético e propiônico e 1,2-propanodiol, maior população de BAL, inversamente proporcional à de leveduras, e baixos teores de etanol durante toda a fermentação.

Trabalhos feitos com *L. hilgardii* mostraram que cepas podem degradar as aminas biogênicas histamina, tiramina e putrecina (GARCÍA-RUIZ et al., 2011) que, quando presentes em silagens, diminuem sua palatabilidade (CARDOZO et al., 2013; REIS; TEIXEIRA; SIQUEIRA, 2006). O *L. hilgardii* é capaz de degradar o aminoácido arginina e produzir amônia, que poderá ser utilizada como energia adicional pela BAL e, apesar de ter efeito neutralizante sobre ácidos desejáveis (PEREIRA et al., 2007), tem controle sobre o crescimento de leveduras e fungos filamentosos (SIQUEIRA et al., 2007) e pode aumentar o consumo da silagem (PIRES et al., 2003). Alberto, Farías e Nadra (2001) descreveram que o *L. hilgardii* degrada ácido gálico, constituinte do tanino, que é responsável por reduzir o consumo e a digestibilidade da silagem (BOSSI et al., 2007; CAMPOS; COUTO; HOGG, 2003; REED, 1995).

Além dessas características, Heintl et al. (2012) descreveram que o metabolismo de *L. hilgardii* apresenta algumas semelhanças com o de *L. buchneri*, dentre elas a classificação como heterofermentador obrigatório, a capacidade de produzir 1,2-propanodiol e o genoma do *L. buchneri* codificar cerca de 8 proteínas precursoras da camada S, que pode estar presente em algumas cepas de *L. hilgardii* (DOHM et al., 2011).

Tais evidências proporcionam maiores interesses no efeito da inoculação do *L. hilgardii* em forragens, principalmente na conservação de cana-de-açúcar, que apresenta alta perda de MS e contaminação por leveduras deterioradoras e produtoras de etanol. Com isso, o trabalho foi realizado o objetivo de, a partir das análises química, bromatológica e microbiológica, avaliar a qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com diferentes doses de *L. hilgardii* CCMA 0170.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reativação da cepa de *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170

A cepa *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 estava armazenada a 80 °C negativos. A reativação foi realizada em tubo contendo 5 mL de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (HYMEDIA®), incubado por 48 horas, a 35 °C. Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL da cultura foi espalhada em placa de Petri contendo 20 mL de ágar MRS, para a verificação da pureza.

2.2 Avaliação do perfil fermentativo das silagens

2.2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e o esquema montado a partir do fatorial tipo 4 (tempo das aberturas) x 3 (doses do inoculante), com 4 repetições. Os tempos de abertura foram de zero (forragem), 5, 15 e 45 dias de fermentação. Doze silos foram montados para cada tempo, sendo quatro para as silagens inoculadas com o *L. hilgardii* CCMA 0170 a 5 log UFC g⁻¹, quatro para a concentração de 6 log UFCg⁻¹ do inoculante e quatro para os controles.

2.2.2 Condições da forragem, silos laboratoriais e inoculante

A cana foi colhida com, aproximadamente, 12 meses de crescimento, sendo os colmos cortados manualmente e processados em picadeira estacionária. Os silos experimentais eram cilindros compostos de cloreto de polivinila (PVC)

com capacidade para 3 kg de forragem e equipados com válvula para a liberação do gás formado na respiração.

O inoculante foi crescido em sucessivos cultivos, até atingir uma população viável de 5 e 6 log UFC g⁻¹ de forragem, populações as quais foram verificadas por meio de plaqueamento em superfície no meio MRS. Para que os inoculantes estivessem na população de 5 e 6 log UFC g⁻¹ na forragem, no momento da ensilagem, 33 mL da biomassa fresca dos inoculantes foram homogeneizados com 80 mL de água destilada e pulverizados sobre a forragem a ser ensilada. O mesmo volume de água destilada foi adicionado ao tratamento controle, para garantir igual umidade nas silagens (SANTOS; ÁVILA; SCHWAN, 2013).

2.2.3 Análises químico-bromatológicas das silagens

Inicialmente, as amostras de 25 g da forragem de cada silagem foram pré-secas em estufa de ventilação forçada, a 55 °C, por 72 horas e, em seguida, foram moídas em moinho tipo Willey com malha de 1 mm (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1990). A determinação dos teores de proteína bruta (PB) e MS total foi feita conforme a AOAC (1990). A quantificação das fibras de detergente neutro (FDN) foi realizada conforme Pell e Schofield (1993). A análise dos CHO foi feita pelo método colorimétrico, conforme Dubois et al. (1956). A determinação do pH foi realizada a partir do mesmo extrato utilizado para o estudo microbiológico, por meio da leitura em potenciômetro digital (Digimed Analítica, modelo 20®), conforme Cherney e Cherney (2003). A determinação das perdas de MS foi feita a partir da equação, segundo Jobim et al. (2007), $PMS = 100 - (MFab \times MSab) / (MFfe \times MSfe) \times 100$, em que PMS é a porcentagem de perdas de MS, MFab é a massa da

forragem na abertura, MSab é o teor de MS na abertura, MFfe é a massa da forragem no fechamento do silo e MSfe é o teor de MS no fechamento do silo.

2.2.4 Análise dos metabólitos nas silagens

Na análise de metabólitos da forragem e das silagens, amostras de 25g foram diluídas em 225 mL de água destilada estéril e homogeneizadas em misturador orbital Tecnal – TE140, durante 20 minutos, a 150 rotações por minuto (rpm). Em seguida, 2 mL do extrato foram retirados e acidificados com 0,01 mL de solução de ácido sulfúrico 50% (vol/vol), promovendo a parada total do metabolismo microbiano na amostra (quenching), de acordo com metodologia descrita por Fussell e McCalley (1987).

Os ácidos láctico, acético e propiônico, etanol e 1,2 propanodiol foram determinados por HPLC, de acordo com metodologias citadas por Duarte et al. (2009). O cromatógrafo utilizado foi o Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp. Japão) e a identificação dos compostos foi determinada a partir das curvas de calibração dos padrões conhecidos. A coluna foi de exclusão de íons modelo Shim-pack SC-101H, de 30 cm de comprimento e 7,9 mm de diâmetro, funcionando a 50 °C. A fase móvel foi uma solução de ácido perclórico com pH 2,1 e fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. A detecção do etanol e 1,2 propanodiol foi realizada por índice de refração (RID 10A) e a dos ácidos orgânicos por radiação ultravioleta com comprimento de onda de 210 nm (UV – Vis/SPD - 10Ai).

2.2.5 Análise da microbiota das silagens

A análise da microbiota epífita e após a ensilagem foi feita a partir de amostras compostas de 25 g de silagem diluídas assepticamente em 225 mL de

água peptonada 0,1% estéril e agitadas em agitador orbital Tecnal – TE140, durante 20 minutos a 120 rpm. O extrato obtido foi submetido a uma diluição decimal seriada até 10^{-6} . A partir das diluições, alíquotas de 0,1 mL foram espalhadas, em triplicata, com o auxílio de alça de Drigalsk, nos meios de cultivos.

A quantificação de BAL foi feita em meio MRS acrescido de nistatina 0,4% e incubado a 30 °C, por 48 horas. A contagem de leveduras e de fungos filamentosos foi realizada no meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (HYMEDIA®), incubado a 30 °C, por 48 horas, para leveduras e 120 horas para fungos filamentosos.

2.2.6 Análise estatística

Os dados químicos, bromatológicos e microbiológicos foram comparados por análise de variância (ANAVA) e suas médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sistema de Análise de Variância (SISVAR).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características da planta de milho

O teor de MS na cana-de-açúcar foi de 384,93 g kg⁻¹; o de CHO, de 160,82 g kg⁻¹ MS; as frações de FDN foram de 523,32 g kg⁻¹ MS; PB apresentou teor de 31,97 g kg⁻¹ MS e o pH da forragem estava em 6,32. Estes valores estão divergindo dos encontrados na literatura, mostrando que a cana-de-açúcar é muito variável quanto à idade de corte, época de colheita, acúmulo tardio de sacarose e outros fatores ambientais (ÁVILA et al., 2012; CARVALHO et al., 2014b; PEDROSO et al., 2011; ROTH et al., 2010; SCHIMIDT et al., 2014) (TABELA 1).

A contagem da microbiota epífita foi de 5 log UFC g⁻¹ de BAL, 5,38 log UFC g⁻¹ de leveduras e 5,04 log UFC g⁻¹ de fungos filamentosos (TABELA 1). A população epífita de BAL é muito variável com as características da planta. A população de leveduras é em torno de 6 log UFC g⁻¹ e a população de fungo filamentoso, normalmente, é maior que a de bactérias lácticas e leveduras (CABRAL JÚNIOR et al., 2009).

Na cana-de-açúcar antes de ensilar não foram encontradas concentrações de ácidos láctico, acético e propiônico, etanol e 1,2 propanodiol. No trabalho de Pedroso et al. (2011) também não foram registradas concentrações para esses metabólitos.

Tabela 3 Características químico-bromatológicas, microbiológicas e metabólicas da cana-de-açúcar, antes de ensilar

Variável	Forragem
Matéria seca	384,93
Ph	6,32
<i>Teores em g kg⁻¹ MS</i>	
Carboidratos solúveis	160,82
Fibra em detergente neutro	523,32
Proteína bruta	31,97
<i>Populações em log UFC g⁻¹</i>	
Bactérias do ácido láctico	5
Leveduras	5,38
Fungos filamentosos	5,04
<i>Concentrações em g kg⁻¹ MS</i>	
Ácido láctico	0
Ácido acético	0
Ácido propiônico	0
Etanol	0
1,2 propanodiol	0

3.2 Perfil fermentativo das silagens

Os teores de CHO, MS, FDN e a porcentagem de perda de MS das silagens foram influenciados pela interação entre o tempo de ensilagem e as dosagens do inoculante ($p < 0,05$). Houve efeito significativo ($p < 0,04$) do tempo de ensilagem sobre os valores de pH. Não foi observado efeito significativo ($p < 0,05$) do tempo de ensilagem e das doses de inoculação do *L. hilgardii* CCMA 0170 sobre o teor de PB (Tabela 2).

Tabela 4 Probabilidade do efeito (P) dos fatores silagem e tempo de fermentação na composição das silagens de cana-de-açúcar

Variável	P		
	Silagem	Tempo	Interação
pH	>0,05	<0,05	>0,05
Matéria seca (g kg ⁻¹)	<0,05	<0,05	<0,05
Perda de matéria seca (%)	<0,05	<0,05	<0,05
<i>Teores em g kg⁻¹ MS</i>			
Carboidratos solúveis em água	<0,05	<0,05	<0,05
Fibra em detergente neutro	<0,05	<0,05	<0,05
Proteína bruta	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Populações em log UFC g⁻¹</i>			
Bactérias do ácido láctico	<0,05	<0,05	<0,05
Leveduras	<0,05	<0,05	<0,05
Fungos filamentosos	>0,05	<0,05	>0,05
<i>Concentrações em g kg⁻¹ MS</i>			
Ácido láctico	>0,05	<0,05	>0,05
Ácido acético	<0,05	<0,05	<0,05
Ácido propiônico	<0,05	<0,05	<0,05
Etanol	<0,05	<0,05	<0,05
1,2 propanodiol	<0,05	<0,05	<0,05

Os teores de CHO nas silagens controle e inoculadas reduziram significativamente ($p < 0,05$) em todos os tempos de abertura, porém, não foram diferentes entre si ($p > 0,05$). A silagem controle, com 5 dias de fermentação, reduziu para 118,41 g kg⁻¹ MS; com 15 dias, para 55,18 g kg⁻¹ MS e, no final no processo fermentativo, alcançou 52,98 g kg⁻¹ MS, reduzindo 67,06% dos CHO. A silagem inoculada com 5 log UFC g⁻¹, aos 5 dias de fermentação apresentava 123,51 g kg⁻¹ MS de CHO; com 15 dias, 69,67 g kg⁻¹ MS e, aos 45 dias de ensilagem, 58,18 g kg⁻¹ MS, totalizando uma perda de CHO de 63,82%. Na silagem com 6 log UFC g⁻¹, o teor de CHO, ao quinto dia de fermentação, atingiu 124,23 g kg⁻¹ MS; com 15 dias, 109,09 g kg⁻¹ MS e, com 45 dias de ensilagem, 71,53 g kg⁻¹ MS, totalizando 55,52% de perda (Gráfico 1).

Mesmo que os teores finais não sejam diferentes estatisticamente, é possível notar que a silagem controle apresentou maior redução, seguida da silagem inoculada com 5 e, depois, 6 log UFC g⁻¹, mostrando que uma maior quantidade de bactéria consumiu menos CHO e proporcionou pH ácido eficientemente. Os teores encontrados são superiores aos relatos por Valeriano et al. (2009) que estudaram a inoculação das cepas *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. buchneri* (Pioneer 11A44TM), *L. plantarum* (Biomax®) e *L. buchneri* (Lalsil C).

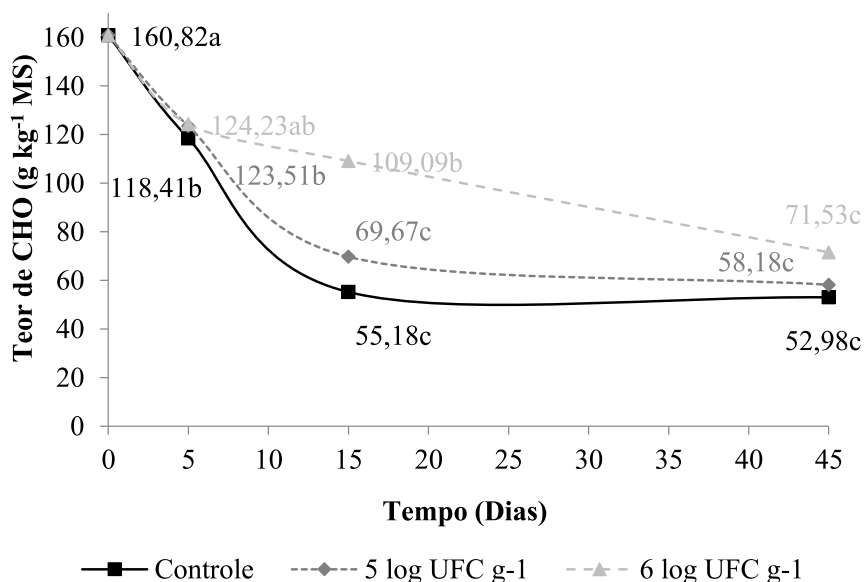


Gráfico 15 Teores de carboidratos solúveis durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

Os valores de pH decaíram significativamente ($p < 0,05$) até 15 dias de fermentação, quando se estabilizou até o final da ensilagem. Após o quinto dia de ensilagem, foi observada uma queda significativa do pH ($p < 0,05$), partindo de 6,32 na forragem e atingindo 4,01, valor que já se enquadra dentro da faixa ótima de inibição de microrganismos deterioradores e conservação da forragem

(KLEINSCHMIT; KUNG JUNIOR, 2006). Com 15 dias de fermentação, o pH decaiu significativamente ($p < 0,05$) para 3,73 e, a partir daí, se estabilizou. Ao final da ensilagem, com 45 dias, atingiu 3,56 (Gráfico 2). Somente o baixo pH final não garante que a atividade dos microrganismos indesejáveis seja prevenida; é necessário que a redução do pH seja rápida. Em silagem de cana-de-açúcar, a estabilidade do pH ocorre, normalmente, antes do décimo dia de ensilagem e no quarto dia já é possível observar o pH próximo de 4,0 (FREITAS et al., 2006).

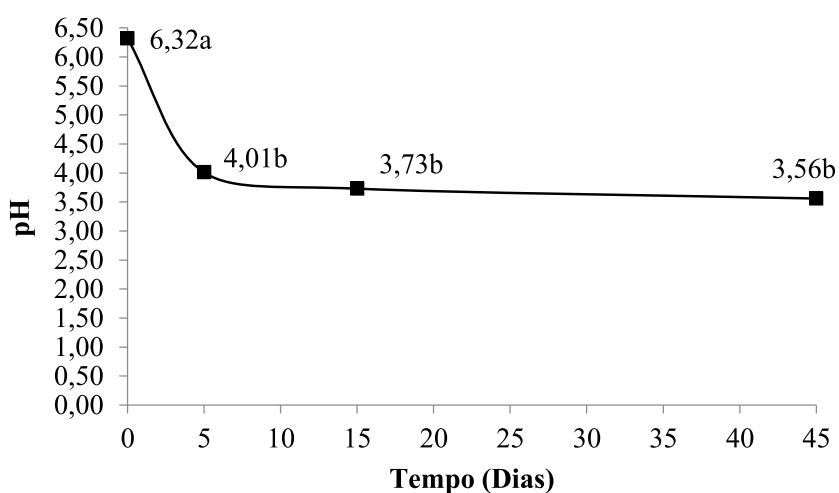


Gráfico 16 Valores médios do pH durante o processo de fermentação da silagem de cana-de-açúcar

O teor de MS na silagem controle manteve-se estabilizado até o quinto dia de fermentação, atingindo $364,91 \text{ g kg}^{-1}$; com 15 dias de ensilagem ocorreu redução significativa ($p < 0,05$) e o teor de MS chegou a $310,05 \text{ g kg}^{-1}$, estabilizando-se e alcançando $315,45 \text{ g kg}^{-1}$ no final do processo. As silagens inoculadas com o *L. hilgardii* CCMA 0170, na concentração de 5 e 6 log UFC g^{-1} , não apresentaram redução e diferença significativa entre elas ($p > 0,05$),

chegando ao quinto dia de ensilagem com 390,12 e 386,38 g kg⁻¹, respectivamente. Com 15 dias de fermentação, as silagens inoculadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹ atingiram 379,18 e 387,27 g kg⁻¹ de MS. No final do processo fermentativo, as silagens apresentaram teor de MS de 378,88 e 381,56 g kg⁻¹, para as silagens com 5 e 6 log UFC g⁻¹, respectivamente (Gráfico 3). A redução nos teores de MS, durante a fermentação de silagens, é decorrente da atividade metabólica de microrganismos durante o processo fermentativo, sendo consensual na literatura. Contudo, a redução não pode ser elevada, pois indica menor disponibilidade de nutrientes disponíveis para o animal (ÁVILA et al., 2008; PEDROSO et al., 2005).

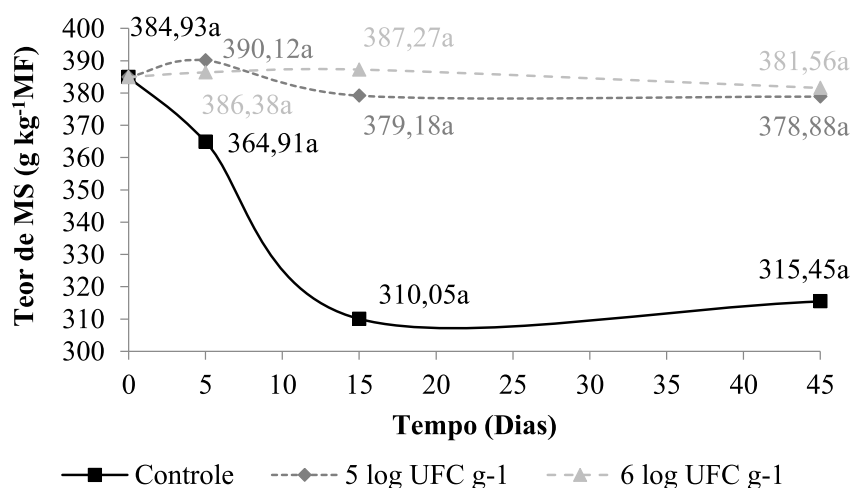


Gráfico 17 Teores de matéria seca durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

As frações de FDN na silagem controle mantiveram-se estáveis até o quinto dia de fermentação, chegando a 566,15 g kg⁻¹ MS; com 15 dias de ensilagem teve um aumento significativo ($p < 0,05$) na fração fibrosa, atingindo 679,10 g kg⁻¹ MS e estabilizando-se até o final do processo, quando alcançou 713,03 g kg⁻¹ MS. As silagens inoculadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹, no quinto dia

de fermentação, tiveram aumento significativo ($p < 0,05$) no teor da FDN, atingindo 573,75 e 579,73 g kg^{-1} MS e, então, estabilizaram-se até o final da ensilagem, quando alcançaram 594,38 e 598,66 kg^{-1} MS. (GRÁFICO 4). O aumento da FDN pode ser explicado pelo consumo de CHO e perdas, aumentando a concentração das fibras na MS e elevando, numericamente, o teor de FDN (CUMMINS et al., 2007). Apenas a silagem controle diferiu significativamente das demais ($p < 0,05$) e seu alto valor pode ser explicado pelo maior consumo de carboidratos por microrganismos indesejáveis, que aumenta a proporção das fibras na silagem (SCHMIDT et al., 2011).

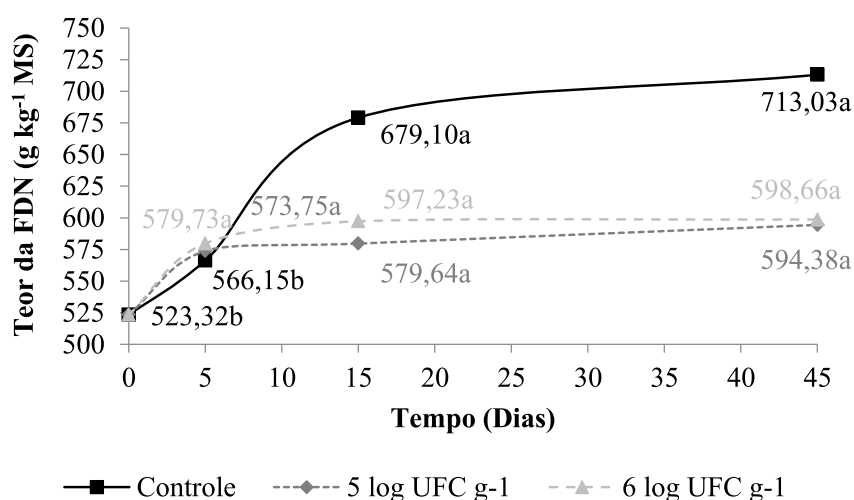


Gráfico 18 Teores de fibra em detergente neutro durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

A porcentagem de perda de MS aumentou significativamente em todas as silagens, tendo a silagem controle apresentado maior perda (29,51%) e diferido significativamente das demais ($p < 0,05$), que chegaram a 10,85% (5 log UFC g^{-1}) e 11,31% (6 log UFC g^{-1}) (Gráfico 5). A porcentagem de perda mais elevada na silagem controle pode ser em decorrência do crescimento de

leveduras que produzem etanol e CO₂ (VALERIANO et al., 2009). É importante salientar que as silagens inoculadas apresentaram menores perdas que a silagem controle, evidenciando a ação benéfica do *L. hilgardii* CCMA 0170 em inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis e diminuir as perdas, acarretando em silagens de melhor qualidade.

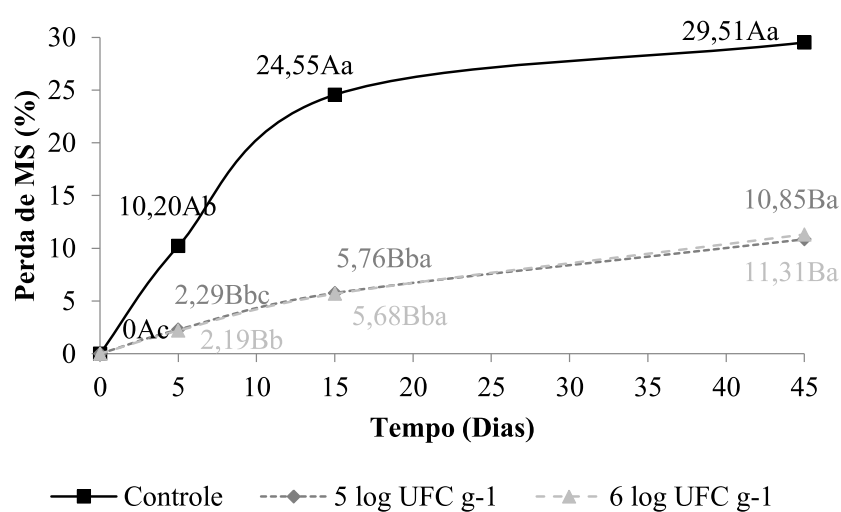


Gráfico 19 Porcentagem de perda de matéria seca durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

As populações de bactérias lácticas e leveduras foram influenciadas pela interação entre o tempo de ensilagem e as concentrações do inoculante ($p < 0,05$). Houve efeito significativo ($p < 0,05$) do tempo de fermentação sobre a população de fungos filamentosos (Tabela 2).

A população de BAL, tanto para as silagens inoculadas quanto para a silagem controle, aumentou significativamente ($p < 0,05$) a partir do quinto dia de fermentação, estabilizando-se até o final do processo. Até os 45 dias de fermentação, as silagens inoculadas eram estatisticamente iguais ($p > 0,05$) quanto à população de BAL, diferindo da silagem controle ($p < 0,05$). Contudo,

ao final da ensilagem, todas apresentaram a mesma população estatisticamente, não sendo diferentes entre si ($p > 0,05$). A silagem controle, inoculada com 5 e com 6 log UFC g⁻¹, apresentaram, respectivamente, 8,63, 9,40 e 9,42 log UFC g⁻¹, no quinto dia de fermentação. Com 15 dias de ensilagem, as populações eram de 8,72, 9,45 e 9,47 log UFC g⁻¹, para as silagens controle, inoculadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹, respectivamente. No final do processo fermentativo, a silagem controle e as inoculadas com 5 e 6 log UFC g⁻¹ apresentaram, respectivamente, 9,16, 9,54 e 9,53 log UFC g⁻¹ de BAL (Gráfico 6). As contagens encontradas neste trabalho são superiores às encontradas por Ávila et al. (2008). A estabilização do crescimento é esperada e ocorre pela redução de substrato utilizado como fonte de energia e pelo acúmulo de metabólitos tóxicos produzidos pelos próprios microrganismos envolvidos na fermentação (DUARTE et al., 2009). A estabilização da fermentação em silagem de cana-de-açúcar é comum e característica (VALERIANO et al., 2009).

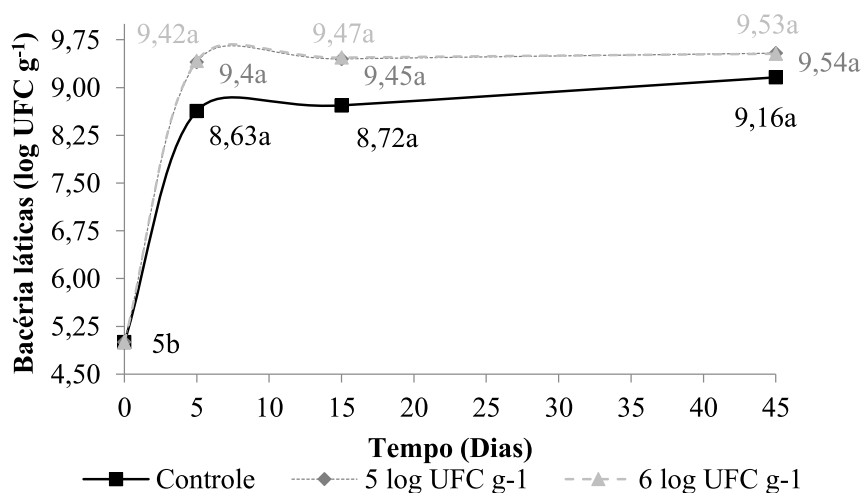


Gráfico 20 População de bactérias lácticas durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

A população de levedura reduziu significativamente ($p < 0,05$) em todas as silagens, entretanto, a população final na silagem controle foi maior que nas silagens inoculadas e estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). A silagem controle reduziu sua população para $4,34 \log \text{ UFC g}^{-1}$, enquanto a silagem inoculada com 5 e 6 $\log \text{ UFC g}^{-1}$ de BAL atingiu $2,07 \log \text{ UFC g}^{-1}$ (GRÁFICO 7). Assim como na população de BAL, um decréscimo na população de leveduras, mesmo na silagem controle, era esperado, devido à redução de substratos e à presença de metabólitos tóxicos (DUARTE et al., 2009). A maior redução da população de leveduras nas silagens tratadas com o *L. hilgardii* CCMA 0170 sugere que essa cepa foi benéfica, reduzindo a população de levedura e, conseqüentemente, a concentração de etanol nas silagens (SCHMIDT et al., 2014). Ávila et al. (2008) também relataram decréscimo na população de leveduras ao longo do processo fermentativo da silagem de cana-de-açúcar, observando-se $6,34 \log \text{ UFC g}^{-1}$, aos 10 dias e $5,36 \log \text{ UFC g}^{-1}$, após 75 dias de fermentação.

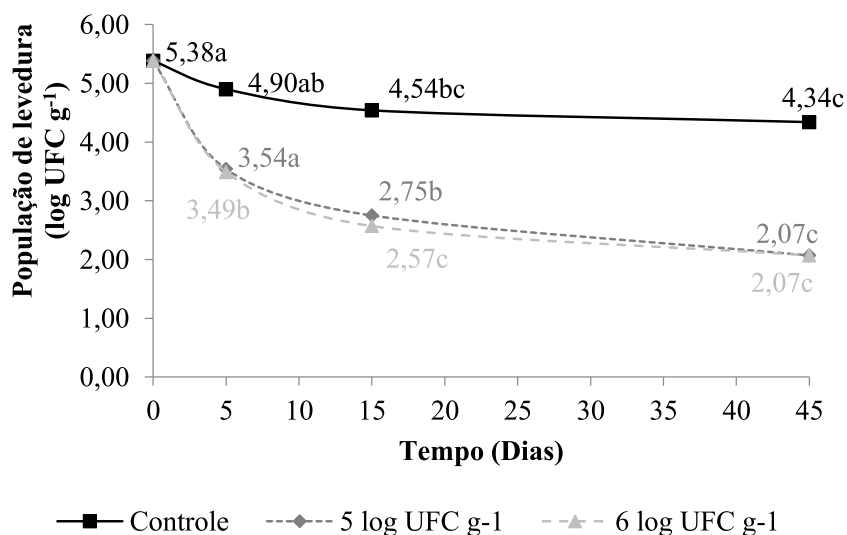


Gráfico 21 População de leveduras durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

A população de fungo filamentosos reduziu significativamente ($p < 0,05$) até o quinto dia de ensilagem, quando atingiu $1,64 \log \text{ UFC g}^{-1}$; com 15 dias houve redução, porém, não significativa, para $1,02 \log \text{ UFC g}^{-1}$ e, por fim, aos 45 dias, a população reduziu significativamente e chegou a zero ($p < 0,05$), mostrando a eficiência da cepa inoculada em produzir metabólitos inibitórios ao crescimento de fungos filamentosos deterioradores (Gráfico 8).

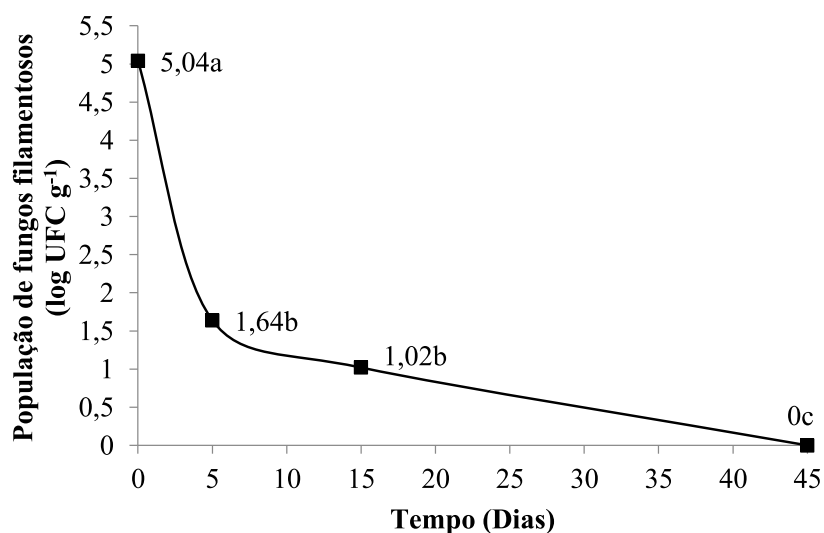


Gráfico 22 População de fungos filamentosos durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

As concentrações de ácido acético e propiônico, etanol e 1,2 propanodiol foram influenciadas pela interação entre o tempo de fermentação e as doses de inoculantes aplicadas ($p < 0,05$). A concentração de ácido lático sofreu efeito apenas do tempo de ensilagem ($p < 0,05$) (Tabela 2).

A concentração de ácido lático, independente da inoculação das BAL, teve um aumento significativo ($p < 0,05$), partindo de zero g kg^{-1} MS na forragem e, no quinto dia de fermentação, com uma produção mais intensa, chegou a $27,15 \text{ g kg}^{-1}$ MS; com 15 dias de fermentação, o acúmulo chegou a $43,54 \text{ g kg}^{-1}$

MS, estabilizando e atingindo 48,62 g kg⁻¹ MS no final da ensilagem (Gráfico 9). A população de BAL, até o quinto dia de fermentação, apresentou alta atividade metabólica e aumentou significativamente, portanto, o abaixamento rápido no pH neste tempo, como consequência da alta produção de lactato, já era esperado. As concentrações de lactato relatadas neste trabalho são superiores às encontradas no trabalho de Schmidt et al. (2011), quando inocularam *L. buchneri* em silagem de cana-de-açúcar. Contudo, quando inocularam a combinação de *L. brevis*, *Enterococcus faecium* e *L. plantarum*, as concentrações descritas são próximas à inoculação de *L. hilgardii* CCMA 0170.

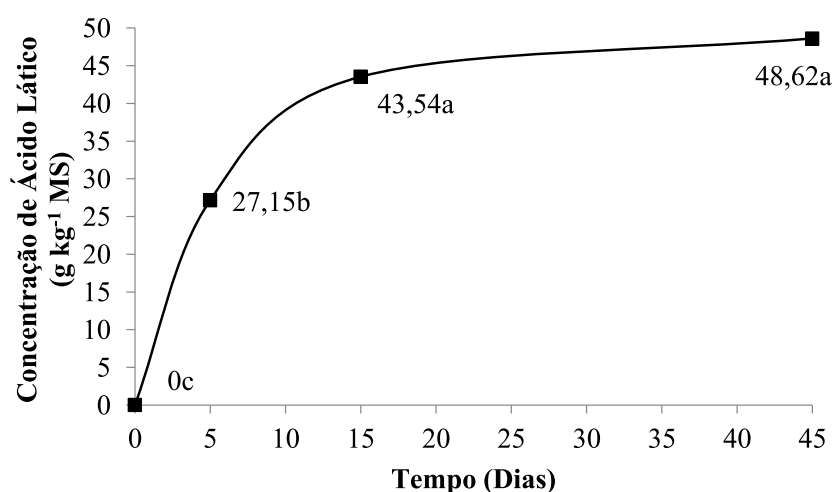


Gráfico 23 Concentração de ácido láctico durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

A concentração de ácido acético na silagem controle não aumentou significativamente ($p > 0,05$), talvez pelo fato de não apresentar BAL heterofermentativas na microbiota epífita. Com 5 dias de fermentação foi observado um aumento não significativo ($p > 0,05$) (3,71 g kg⁻¹ MS) e, aos 15 dias, um decaimento (3,49 g kg⁻¹ MS), até atingir a concentração final de 2,89 g

kg⁻¹ MS, resultado próximo ao relatado por Schmidt et al. (2011). Nas silagens inoculadas, em ambas as doses, o aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de ácido cético ocorreu apenas com 15 dias de fermentação, quando atingiram 9,26 g kg⁻¹ MS (5 log UFC g⁻¹) e 10,38 g kg⁻¹ MS (6 log UFC g⁻¹). Em seguida, estabilizaram-se e, aos 45 dias do processo fermentativo, aumentaram pouco ($p > 0,05$), estatisticamente, suas concentrações para 13,51 g kg⁻¹ MS (5 log UFC g⁻¹) e 10,53 g kg⁻¹ MS (6 log UFC g⁻¹) (Gráfico 10). O aumento tardio desse ácido pode ser decorrente da utilização do ácido lático por bactérias heterofermentativas, como o inoculante *L. hilgardii* utilizado, e sua produção é devido à falha na enzima acetaldeído desidrogenase, que impede que o acetaldeído seja transformado em etanol, sendo convertido em acetato (OUDE ELFERINK et al., 2001). A presença desse ácido na silagem exerce importante papel antifúngico, sendo um importante inibidor de leveduras e, portanto, propicia menor concentração de etanol na silagem (DANNER et al., 2003). Os teores de ácido acético estão de acordo com o estudo feitos por Zopollatoo et al. (2009) que, fazendo uma revisão de trabalhos com silagem de cana-de-açúcar, observaram que os valores, máximo e mínimo, encontrados eram de 9,3% e 1,6%.

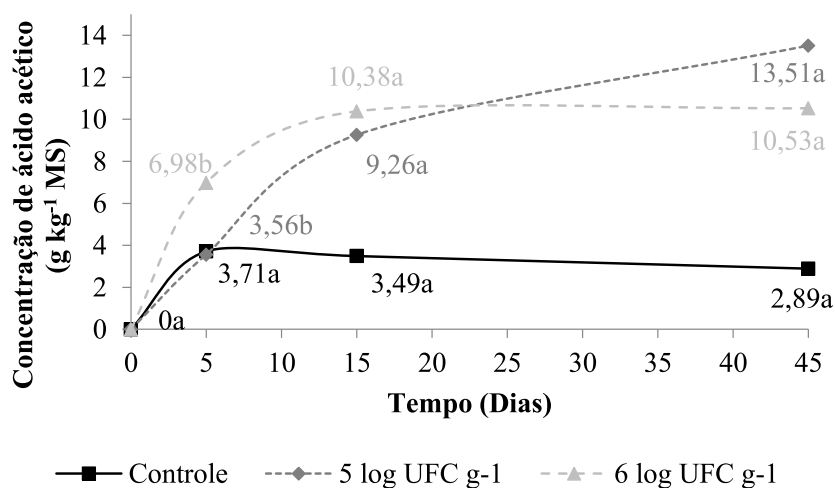


Gráfico 24 Concentração de ácido acético durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

A presença de ácido propiônico na silagem é devido ao metabolismo do 1,2 propanodiol ou do ácido lático. Em todas as silagens houve aumento significativo desse ácido ($p < 0,05$), menos na silagem controle ($p > 0,05$), que atingiu a concentração máxima de $0,44 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$. As silagens inoculadas com 5 e 6 log UFC g^{-1} de BAL apresentaram 1,04 e 3,15 $\text{g kg}^{-1} \text{ MS}$, respectivamente (Gráfico 11). O 1,2 propanodiol não foi detectado na silagem controle, provavelmente pela inexistência de bactérias capazes de converter o ácido lático em acético e 1,2 propanodiol. Nas silagens tratadas com 5 e 6 log UFC g^{-1} de BAL, a concentração do 1,2 propanodiol foi de 0,006 e 0,005 $\text{g kg}^{-1} \text{ MS}$, respectivamente (Gráfico 12).

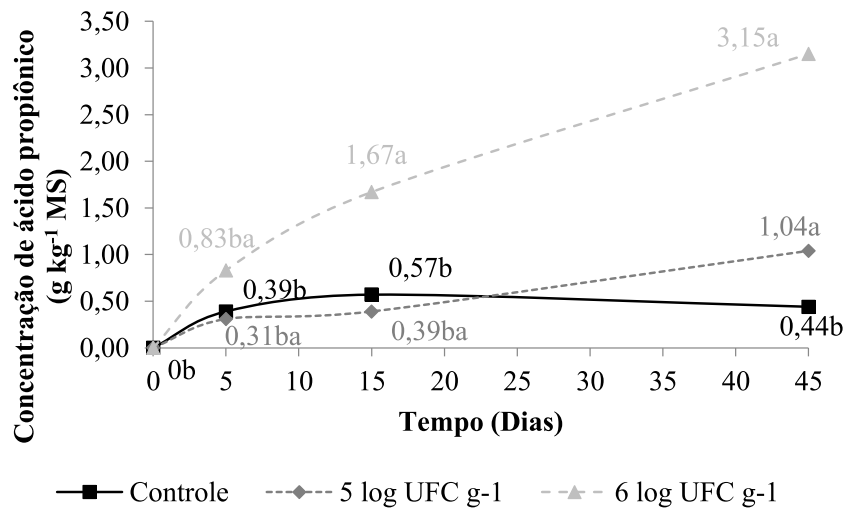


Gráfico 25 Concentração de ácido propiônico durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

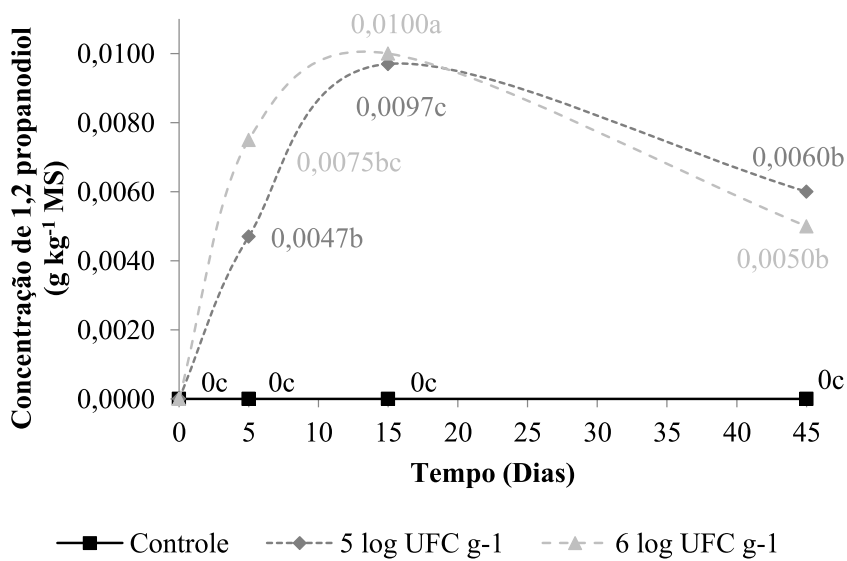


Gráfico 26 Concentração de 1,2 propanodiol durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

A concentração de etanol na silagem controle aumentou significativamente ($p < 0,05$) a partir do quinto dias de fermentação ($14,08 \text{ g kg}^{-1}$ MS), atingindo $90,02 \text{ g kg}^{-1}$ MS ao final do processo fermentativo e sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) das silagens inoculadas, que chegaram a $25,19 \text{ g kg}^{-1}$ MS ($5 \log \text{ UFC g}^{-1}$) e $5,69 \text{ g kg}^{-1}$ MS ($6 \log \text{ UFC g}^{-1}$), não aumentando e nem diferindo significativamente no decorrer do processo fermentativo ($p < 0,05$) (Gráfico 13). Os valores observados mostram claramente o efeito da adição do *L. hilgardii* CCMA 0170 nas silagens, indicando que sua inoculação reduziu a população de leveduras e, conseqüentemente, a produção de etanol, proporcionando uma silagem de melhor qualidade. Foi observada baixa produção de etanol, que pode ser explicada devido ao metabolismo do *L. hilgardii*, assim como de *L. buchneri*, produzir quantidades traço de etanol como subproduto (KLEINSCHMIT; KUNG JUNIOR, 2006).

Zopollatoo et al. (2009) realizaram uma revisão bibliográfica de artigos científicos publicados sobre diferentes forragens, mostrando que, na silagem de cana-de-açúcar, de 1999 a 2009, nenhum trabalho publicado reduziu significativamente a concentração de etanol.

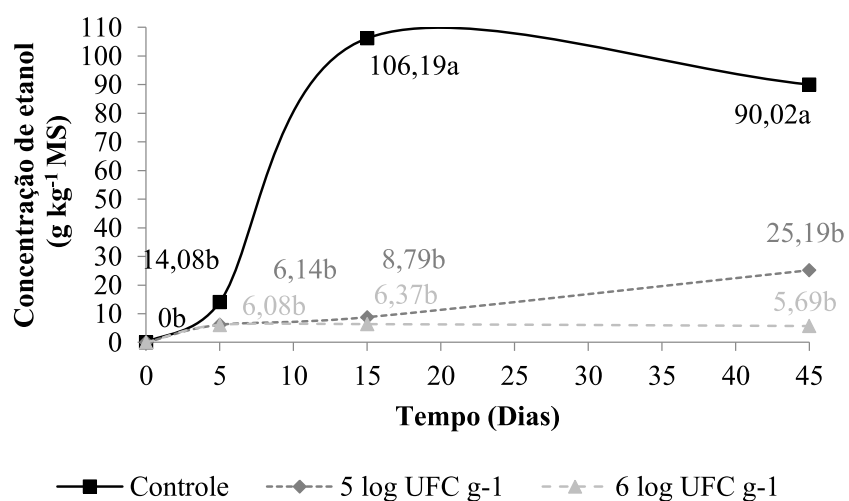


Gráfico 27 Concentração de etanol durante o processo de fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas e controle

Observando-se os dados descritos neste trabalho, é importante relatar que as duas doses de inoculantes aplicadas contribuíram significativamente ($p < 0,05$) para uma silagem de qualidade, e estatisticamente não foram observadas diferenças entre suas aplicações ($p > 0,05$).

4 CONCLUSÃO

A inoculação do *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170 melhorou a qualidade das silagens de cana-de-açúcar, independente das doses aplicadas, devido ao menor consumo de carboidratos solúveis para atingir um pH mais ácido, produção de metabólitos que sinergicamente inibiram o crescimento de leveduras e, conseqüentemente, menor produção de etanol.

As doses de inoculante não foram estatisticamente diferentes, mas em alguns parâmetros foram observados resultados melhores para a silagem inoculada com a maior dose de inoculante.

O *Lactobacillus hilgardii* CCMA 0170, isolado de silagem de cana-de-açúcar, apresenta qualidades básicas para um bom inoculante microbiológico e, dessa forma, estudos para avaliar sua performance em outros tipos de forragem são necessários.

REFERÊNCIAS

- ALBERTO, M. R.; FARIÁS, M. E.; NADRA, M. C. M. Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4359-4363, Sept. 2001.
- ASSIS, F. G. do V. de et al. New inoculants on maize silage fermentation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 43, n. 8, p. 395-403, 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1.
- ÁVILA, C. L. da S. et al. Aerobic stability of sugar cane silages with a novel strain of *Lactobacillus* sp. isolated from sugar cane 1. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 41, n. 2, p. 249-255, 2012.
- ÁVILA, C. L. da S. et al. Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 255-261, Nov. 2008.
- ÁVILA, C. L. da S. et al. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 2, p. 940-951, Feb. 2014.
- BOSSI, A. et al. Effect of tannic acid on *Lactobacillus hilgardii* analysed by a proteomic approach. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 3, p. 787-95, Mar. 2007.
- CABRAL JÚNIOR, C. et al. Análise multivariada da microflora epífita em *S. officinarum* ensilada com *G. sepium**. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 58, n. 223, p. 395-404, 2009.
- CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A.; HOGG, T. A. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 167-174, Jan. 2003.
- CARDOZO, M. et al. Artigo aminas biogênicas: um problema de saúde pública. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 5, n. 2, p. 149-168, 2013.

CARVALHO, B. F. et al. Aerobic stability of sugar-cane silage inoculated with tropical strains of lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, Mar. 2014a. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gfs.12117/abstract>>. Acesso em: 1 nov. 2014.

CARVALHO, B. F. et al. Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 1-13, 2014b.

CHERNEY, J. H.; CHERNEY, D. J. Assessing silage quality. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R.; HARRISON, J. (Ed.). **Silages science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 141-198.

CUMMINS, B. et al. Conservation characteristics of grass and dry sugar beet pulp co-ensiled after different degrees of mixing. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, Dublin, v. 48, n. 2, p. 181-193, Dec. 2007.

DANNER, H. et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 562-567, 2003.

DOHM, N. et al. Molecular and biochemical properties of the S-layer protein from the wine bacterium *Lactobacillus hilgardii* B706. **Archives of Microbiology**, New York, v. 193, n. 4, p. 251-261, Apr. 2011.

DUARTE, W. F. et al. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 36, n. 4, p. 557-569, Apr. 2009.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, Mar. 1956.

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

FUSSELL, R. J.; MCCALLEY, D. V. Determination of volatile fatty acids (CrC5) and lactic acid in silage by gas chromatography. **Analyst**, London, v. 112, p. 1213-1216, 1987.

GARCÍA-RUIZ, A. et al. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 148, n. 2, p. 115-120, Aug. 2011.

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

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

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

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

PEDROSO, A. D. F. et al. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, p. 427-432, 2005.

PEDROSO, A. D. F. et al. Fermentation parameters, quality and losses in sugarcane silages treated with chemical additives and a bacterial inoculant. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 11, p. 2318-2322, nov. 2011.

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 9, p. 1063-1073, Sept. 1993.

PEREIRA, E. S. et al. Avaliação da qualidade nutricional de silagens de milho (*Zea mays*, L). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 8-12, 2007.

PIRES, A. J. V. et al. Avaliação do consumo de silagens de sorgo tratadas com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio na alimentação de novilhas $\frac{3}{4}$ Indubrazil /

Holandês. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1525-1531, 2003.

REED, J. D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 5, p. 1516-1528, May 1995.

REIS, R. A.; TEIXEIRA, I. A. M. A.; SIQUEIRA, G. R. Impacto da qualidade da forragem na produção animal. In: SIMPÓSIO REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006. 1 CD-ROM.

ROTH, A. P. D. T. P. et al. Sugarcane silage production treated with additives at different times post burning. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 1, p. 88-96, jan. 2010.

SANTOS, A. O.; ÁVILA, C. L. S.; SCHWAN, R. F. Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 12, p. 7777-7789, Dec. 2013.

SCHMIDT, P. et al. Effects of *Lactobacillus buchneri* on the nutritive value of sugarcane silage for finishing beef bulls 1. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 43, n. 1, p. 8-13, 2014.

SCHMIDT, P. et al. Novos aditivos microbianos na ensilagem da cana-de-açúcar: composição bromatológica, perdas fermentativas, componentes voláteis e estabilidade aeróbia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 3, p. 543-549, mar. 2011.

SIQUEIRA, G. R. et al. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 6, p. 2000-2009, 2007.

SIQUEIRA, G. R. et al. Queima e aditivos químicos e bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 1, p. 103-112, 2010.

VALERIANO, A. R. et al. Efeito da adição de *Lactobacillus* sp. na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 6, p. 1009-1017, 2009.

ZOPOLLATTO, M. et al. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, p. 170-189, jul. 2009. Número especial.