



Universidade Federal de Lavras
Programa de Pós Graduação em Zootecnia
Produção de Ruminantes – Forragicultura e Pastagens

JÉSSICA ROCHA SOUSA GERVÁSIO

**USO DO pH COMO INDICADOR DA DETERIORAÇÃO AERÓBIA
DE SILAGENS DE MILHO EM CONDIÇÕES PRÁTICAS**

Orientador

Thiago Fernandes Bernardes

**LAVRAS – MG
2017**

JÉSSICA ROCHA SOUSA GERVÁSIO

**USO DO pH COMO INDICADOR DA DETERIORAÇÃO AERÓBIA
DE SILAGENS DE MILHO EM CONDIÇÕES PRÁTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador
Dr. Thiago Fernandes Bernardes

**LAVRAS – MG
2017**

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

Gervásio, Jéssica Rocha Sousa.

Uso do pH como indicador da deterioração aeróbia em silagens
de milho em condições práticas : UFLA 2016 / Jéssica Rocha Sousa
Gervásio. - 2017.

39 p. : il.

Orientador(a): Thiago Fernandes Bernardes.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Deterioração Aeróbia. 2. Leveduras. 3. Posições periféricas.
I. Bernardes, Thiago Fernandes. . II. Título.

JÉSSICA ROCHA SOUSA GERVÁSIO

**USO DO pH COMO INDICADOR DA DETERIORAÇÃO AERÓBIA
DE SILAGENS DE MILHO EM CONDIÇÕES PRÁTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 9 de Fevereiro de 2017

Dr. Felipe Nogueira Domingues - UFRA
Dr. Daniel Rume Casagrande - UFLA

Orientador
Dr. Thiago Fernandes Bernardes

**LAVRAS – MG
2017**

*Aos meus pais, sempre presentes e ao meu lado em todas as minhas
decisões.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por tantos momentos bons que tem me proporcionado.

Ao Professor Thiago pela ótima orientação, conselhos, atenção, e incentivo à pesquisa.

Aos demais Professores do NEFOR, Márcio, Daniel e Carla pelos conhecimentos cedidos, e Professor Felipe pela atenção e disponibilidade.

Aos colegas e amigos do NEFOR pela companhia no dia-a-dia e ajuda nesse trabalho, nas coletas das fazendas, no laboratório e nos estudos, em especial ao grupo da Conservação que esteve presente em todas as fases desse trabalho.

Aos meus pais Cidia e Gilson, e minha irmã Lara, que nunca deixaram de estender as mãos quando eu precisei, pela educação, amor e carinho que me sempre deram.

Aos meus familiares em especial tia Maria e Vó Aurita por tanto amor e preocupação.

Ao Felipe por ser minha melhor companhia em todos os momentos e por deixar meus dias infinitamente mais alegres, e toda à sua família pelo carinho.

Às melhores “irmãs” com que eu tive o prazer de conviver na Rep. Dama de Copos, Beth, Helô, Frô e Cris, ao ombro amigo sempre que precisei, às risadas, e à excelente convivência que tivemos.

Às amigas que cultivei na Zootecnia em especial minhas melhores companheiras Tamara, Laura, Mayra, Marina, Isabela e Ariane pela torcida, apoio e tantos momentos bons compartilhados.

Aos funcionários do DZO pela disposição e contribuição no projeto.

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de Pós- Graduação em Zootecnia pela oportunidade de realização do mestrado.

A CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro.

RESUMO GERAL

O objetivo do estudo foi verificar se o pH melhor se relaciona com a deterioração aeróbia do que a temperatura. Amostras de silagem foram coletadas em vinte e cinco propriedades rurais do Sul de Minas Gerais no período de Novembro de 2015 a Dezembro de 2016. Foram realizadas avaliações de temperatura, densidade e coleta de amostras para composição química, fermentativa e microbiológica em quatro posições no silo: três posições periféricas (PL, PI e PC) coletadas a 200 mm de profundidade, e uma posição no centro do painel do silo (CT) coletada a 400 mm de profundidade do painel do silo. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com quatro tratamentos e vinte e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o recurso PROC ANOVA do programa SAS 9.1. O Coeficiente de correlação de Pearson foi usado por meio do recurso PROC CORR do programa SAS 9.1 para os dados de temperatura, composição química e microbiológica da silagem de milho e também para as diferenças de pH entre PL,PI , PC e CT. Foram criados os índices de aquecimento (DT 40) e relacionado ao pH (DpH), calculado através das diferenças de temperatura e pH das amostras periféricas das amostras do centro. O tratamento CT apresentou menor valor de pH e contagens de leveduras, e maior concentração de ácido lático e açúcares frente aos outros tratamentos. O crescimento de leveduras acima de 5 log ufc/g se relacionou com maiores valores de temperatura e pH. Os dados deste trabalho mostram que o pH pode ser útil em detectar o processo de deterioração aeróbia em seu estágio inicial, e pode ser usado em conjunto com a temperatura alertando assim os produtores para o início de uma deterioração.

Palavras-chave: Deterioração aeróbia, leveduras, posições periféricas

GENERAL ABSTRACT

The objective of the study was to verify if pH is better related to aerobic deterioration than temperature. Silage samples were collected at twenty-five rural properties in the South of Minas Gerais from November 2015 to December 2016. Temperature, density and sample collection were evaluated for chemical, fermentative and microbiological composition at four positions in the silo: Three peripheral positions (PL, PI and PC) collected at 200 mm depth, and a position in the center of the silo panel (CT) collected at 400 mm depth. The design used was randomized blocks with four treatments and twenty five replicates. Data were submitted to analysis of variance using the PROC ANOVA of the SAS 9.1. The Pearson correlation coefficient was used using the PROC CORR of the same program. The indices DT40 and DpH were created calculated by the temperature and pH differences of the peripheral samples of the center samples. CT treatment showed lower pH and yeast counts, and higher concentration of lactic acid and sugars compared to other treatments. Yeast growth above 5 log cfu / g was associated with higher temperature and pH values. The data from this work show that pH may be useful in detecting the aerobic deterioration process at its early stage and can be used in conjunction with temperature thus prompting producers to begin deterioration.

Key words: Aerobic deterioration, yeasts, peripheral positions

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução Geral	10
INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Silagem de Milho.....	11
2.2 Deterioração Aeróbia.....	12
2.3 Papel das Leveduras na deterioração aeróbia.....	14
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 2 Uso do pH como Indicador da deterioração aeróbia em silagens de milho	20
1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 Obtenção das amostras	23
2.2 Amostragem e Avaliações	24
2.3 Análises Químicas e Microbiológicas	25
2.4 DpH e DT40.....	27
2.5 Análise Estatística	27
3 RESULTADOS	28
4 DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A ensilagem é o principal método de conservação de forragens em países tropicais (ADESOGAN, 2009), sendo a cultura do milho a mais utilizada para produção de silagem em propriedades rurais com atividade leiteira no Brasil (BERNARDES; RÊGO, 2014).

A silagem de milho é usada como fonte de energia e fibra em dietas de bovinos leiteiros, devido à presença do amido e dos carboidratos fibrosos (COSTA et al., 2013). A alta concentração de amido é benéfica por estimular a produção de proteína microbiana no rúmen, aumentando a produção de leite e a concentração de proteína do leite. A presença da fibra estimula a salivação, que tampona a acidez ruminal, evitando assim vários problemas de saúde, sendo também um precursor de gordura do leite (ADESOGAN, 2010).

Dentre as estruturas de estocagem, o silo trincheira é amplamente utilizado nas fazendas zootécnicas (BERNARDES; RÊGO, 2014) por possuir vantagens como: ter um custo relativamente baixo, além de permitir a manipulação de grandes volumes de forragem no momento do abastecimento e desabastecimento (SAVOIE; JOFRIET, 2003). Porém sua configuração permite que grandes áreas do material ensilado estejam expostas ao ambiente (BORREANI; TABACCO; CAVALLARIN, 2007). O ar pode penetrar no interior da massa, em maior escala no topo e nas zonas laterais em contato com a parede (BOLSEN et al., 1993), principalmente no momento de desabastecimento e alimentação, desencadeando a proliferação de microrganismos oportunistas presentes na massa como leveduras e fungos filamentosos. A presença desses microrganismos acarreta perdas no valor nutritivo da silagem pelo consumo de substâncias energéticas presentes na forragem, e como consequência ocorre deterioração aeróbia da silagem (LINDGREN et al., 1985).

O processo de deterioração aeróbia muitas vezes é negligenciado pelos produtores, principalmente quando não há presença de fungos filamentosos na massa, fazendo com que as perdas não sejam visíveis. Porém quando esse processo está ocorrendo na fazenda, o problema não se limita apenas às perdas de matéria seca (MS) (BERNARDES et al., 2015). Quando animais consomem silagem deteriorada, há uma diminuição na ingestão de matéria seca, e conseqüentemente no desempenho, pois estes ficam relutantes em consumir silagens instáveis especialmente durante o verão, quando o consumo já está comprometido (MAHANNA AND CHASE, 2003; KUNG, 2009). Além disso, a ingestão dessas silagens pode ter conseqüências negativas para a saúde animal (LINDGREN et al., 2002), e podem causar contaminação de produtos como o leite e o queijo (TABACCO et al., 2009). Por essas razões identificar deterioração aeróbia da silagem na fazenda é de fundamental importância, evitando perdas econômicas para os produtores.

Diante da relação que existe entre a composição microbiana da silagem durante a fase de desabastecimento do silo e a deterioração aeróbia, fazem-se necessários métodos de fácil mensuração que possam ser utilizados para detectar deterioração aeróbia em silagens, auxiliando os produtores no dia-a-dia na fazenda.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Silagem de Milho

No Brasil, a silagem de milho é a principal fonte de forragem utilizada durante todo o ano em sistemas de confinamento e durante parte do ano em sistemas de pastejo (BERNARDES et al., 2015). Esse fato ocorre, pois a silagem de milho apresenta características que a torna favorável ao processo de ensilagem, tais como, elevado valor nutritivo, elevado potencial de produção de MS e alta ensilabilidade (ALLEN; COORS; ROTH, 2003),

além disso, há a vantagem do processo de colheita e manipulação da silagem serem mecanizados (BERNARDES et al., 2015).

A planta de milho apresenta alta ensilabilidade devido algumas características que influenciam na qualidade da fermentação da massa ensilada, bem como, concentração de MS ideal no momento de corte, alta concentração de carboidratos solúveis e baixo poder tamponante (BUXTON; O'KIELY, 2003). Além disso, o milho é uma cultura flexível, podendo-se fazer silagem da planta inteira ou silagem dos grãos (BERNARDES; MORAIS; SILVA, 2012).

Um fator de grande importância que afeta a qualidade da silagem de milho é sua alta propensão à deterioração quando exposta ao ar, principalmente em ambientes de clima quente (ASHBELL et al., 2002; BERNARDES; ADESOGAN, 2012).

Silagens de milho com adequado padrão fermentativo apresentam altos teores de ácido lático e carboidratos solúveis em água (CSA) remanescentes, que são utilizados como substrato preferencial para o crescimento de leveduras e fungos filamentosos após a abertura do silo, ou até mesmo na fase de armazenamento (se o oxigênio entra em contato com a massa), além disso, essas silagens podem apresentar baixa quantidade de produtos inibidores de microrganismos deterioradores, como o ácido acético (TABACCO et al., 2009).

2.2 Deterioração Aeróbia

Na fazenda, a exposição da silagem ao ar é difícil de ser controlada. Durante o período de armazenamento, o oxigênio pode penetrar na massa por difusão ou através de danos físicos ao filme plástico que veda o silo. Além disso, após a abertura do silo, a exposição ao oxigênio é inevitável, desencadeando o crescimento de microrganismos aeróbios (DRIEHUIS et al., 1999).

O processo de deterioração aeróbia é iniciado pela ação de leveduras, causando elevação do pH, à medida que ocorre o processo de oxidação dos produtos da fermentação da silagem, principalmente de ácido lático (PAHLOW et al., 2003). Em silagem de milho, ocasionalmente as bactérias do ácido acético também podem estar presentes no início da deterioração aeróbia (PAHLOW et al., 2003).

O desenvolvimento de fungos filamentosos acontece em sucessão ao aparecimento das leveduras (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991), e a deterioração causada pelos mesmos determina as perdas de elementos nutritivos e de energia, além do risco de contaminação por micotoxinas (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002).

Desse modo, a manutenção da anaerobiose e a queda do pH constituem os fatores que são responsáveis pela preservação da forragem que está sendo estocada (PAHLOW et al., 2003), pois os microrganismos capazes de deteriorar a silagem são inibidos pelo efeito sinérgico dos ácidos produzidos durante a fermentação. São inibidos também pela pressão osmótica (determinada pela concentração de MS na colheita), além da ausência de oxigênio (WOOLFORD, 1990).

Alguns fatores vão influenciar no aparecimento da deterioração aeróbia durante a etapa de conservação, tais como a disponibilidade de nutrientes, e a temperatura ambiental (não passível de controlar) (ASHBELL et al., 2002). Outros fatores estão relacionados ao manejo durante a ensilagem como: concentração de MS da cultura, tamanho de partícula, taxa de enchimento do silo, compactação, densidade, vedação e uso de aditivos (população de microrganismos). Com relação ao manejo de abertura, a taxa de retirada diária de silagem do painel pode ser determinante no processo de aparecimento da deterioração aeróbia (BORREANI; TABACCO, 2012). Estes fatores têm em comum que, em maior ou menor grau, podem ser controlados com estratégias de manejo.

2.3 O papel das leveduras na deterioração aeróbia

Quando a silagem é exposta ao ar, microrganismos aeróbios podem tornar-se ativos. As leveduras desempenham um papel importante na iniciação da deterioração aeróbia da silagem (JONSSON e PAHLOW, 1984). Estes microrganismos tendem a crescer aerobicamente, mas podem fermentar os açúcares anaerobicamente (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Imediatamente após a ensilagem, leveduras competem com outros microrganismos por substratos fermentáveis, e, durante a primeira semana a população de leveduras pode atingir 10^7 ufc/g (JONSSON e PAHLOW, 1984). Uma diminuição gradual na contagem de leveduras acontece no decorrer da fase de armazenamento, dependendo de fatores como pH, anaerobiose e concentração de ácidos orgânicos (BORREANI; TABACCO, 2009). Jonsson e Pahlow (1984) relataram que a presença de oxigênio aumentou a sobrevivência e o crescimento de leveduras, enquanto um nível elevado de ácido acético reduziu a sua viabilidade durante o armazenamento.

As leveduras não são inibidas pelo baixo pH encontrado nas silagens, sobrevivendo sob limites de pH variando entre 3,5 e 6,5, sendo que algumas cepas podem suportar pH inferior a 2 (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Além disso, tem ótimo crescimento à temperaturas de até 40 °C (TABACCO et al., 2009).

Sob condições aeróbicas as leveduras oxidam os açúcares e o ácido láctico, resultando na produção de CO₂, H₂O e calor e, portanto, causam deterioração (WOOLFORD, 1990) e perda de componentes nutritivos (KUNG et al., 1998).

Segundo Pahlow et al. (2003), as leveduras que degradam o ácido láctico são os microrganismos iniciadores da deterioração aeróbia em silagens de milho. Na presença de O₂, o ácido láctico é transformado em ácido acético, CO₂, e água, acompanhado de elevação da temperatura e do pH da silagem, permitindo bactérias (por exemplo, bacilos) e fungos (*Aspergillus*, *Fusarium*,

Penicillium) crescerem e reduzirem ainda mais a qualidade da silagem (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991 ; TABACCO et al., 2009).

A população de leveduras associada à deterioração de silagens pode ser dividida em dois grupos. O primeiro grupo é constituído por leveduras com alta capacidade de fermentar açúcares, mas capacidade variável de assimilar ácido láctico (SANTOS et al., 2017). Estes organismos incluem *Saccharomyces Cerevisiae* e espécies de *Torulopsis*. O segundo grupo é constituído por leveduras com alta capacidade respiratória e afinidade pelo ácido láctico, que inclui espécies de *Candida*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Hansenula*, e *Endomycopsis* (MOON e ELY, 1979, McDONALD et al., 1991, SANTOS et al., 2017). Segundo Pahlow et al. (2003), leveduras dos gêneros *Candida* e *Hansenula* (*Pichia*) são particularmente prolíficos em aerobiose, pela habilidade de assimilar lactato e pela forte afinidade com a glicose.

A oxidação completa tanto do ácido láctico quanto dos açúcares gera calor (BORREANI; TABACCO, 2009). Portanto, a temperatura pode ser utilizada como um índice de aquecimento associado à deterioração aeróbia, uma vez que os aumentos de temperatura são relacionados com atividade de leveduras e perda de MS e poderiam ter aplicação em alertar os agricultores para o início da deterioração aeróbia (BORREANI; TABACCO, 2009).

Uma vez que um dos substratos utilizados pelas leveduras é o ácido láctico, e, com o consumo deste ocorre aumento dos valores de pH, outro indicador de deterioração é a mensuração das alterações do pH (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

REFERÊNCIAS

ADESOGAN, A.T. Challenges of tropical silage production. In: BRODERICK, G.A. et al. (Ed.). In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15, 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: University of Wisconsin, p. 139–154, 2009.

ADESOGAN, A.T. Corn silage quality in tropical climates. In: V SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DE PASTAGEM, Viçosa. **Proceedings...** Viçosa: UFV, DZO, 2010. p. 311-327, 2010.

ALLEN, M. S.; COORS, J. G.; ROTH, G. W. Corn silage. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Co-ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA, CSSA, SSSA,. Cap. 12, p. 547-608. (Agronomy, 42), 2003

ASHBELL, G. et al. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 28, n. 5, p. 261-263, may. 2002.

BERNARDES, T. F.; ADESOGAN, A. T. Aerobic deterioration of silages in warm climates. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DE PASTAGEM, 6., 2012, Viçosa, MG. **Proceedings...** Viçosa, MG: UFV: DZO, p. 249-268, 2012.

BERNARDES, T. F.; MORAIS, G.; SILVA, N. C. Alternativas de suplementação volumosa na estação seca do ano. **Agricultural report**, Belo Horizonte, v. 33, n. 266, p. 7-14, 2012.

BERNARDES, T. F.; RÊGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 1852-1861, 2014.

BERNARDES, T. F.; SCHMIDT, P.; DANIEL, J. L. P. An overview of silage production and utilization in Brazil. In: **Proceeding... INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE 17**, Piracicaba, Brazil. p. 124-144, 2015.

BORREANI, G.; TABACCO, E.; CAVALLARIN, L. A new oxygen barrier film reduces aerobic deterioration in farm-scale corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 10, p. 4701-4706, Oct. 2007.

BORREANI, G.; TABACCO, E. Effect of silo management factors on aerobic stability and extent of spoilage in farm maize silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012, Hameenlinna. **Proceedings...** Hameenlinna, Finland: MTT Agrifood Research Finland University of Helsinki, p. 71-72, 2012.

BORREANI, G.; TABACCO, E. Temperature measurements of large scale silo face to assess aerobic deterioration of corn silage on farm. In: 33 INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 1., 2009, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro: FEALQ, p. 175-188, 2009.

BOLSEN, K. K. et al. Rate and extent of top spoilage losses in horizontal silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.6, p.2940-2962, 1993.

BUXTON, D. R.; O'KIELY, P. Preharvest plant factors affecting ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Co-ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA, (Agronomy, 42), Cap. 5, p. 199-250, 2003.

COSTA, J. H. C., M. J. HOTZEL, C. LONGO, and L. F. BALCÃO. A survey of management practices that influence production and welfare of dairy cattle on family farms in southern Brazil. **Journal of Dairy Science** 96:307–317, 2013.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p. 583-594, 1999.

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

KUNG, L. Jr., A. C. SHEPERD, A. M. SMAGALA, K. M. ENDRES, C. A. BESSETT, N. K. RANJIT, and J. L. GLANCEY. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. **Journal of Dairy Science** 81:1322–1330,1998.

KUNG, L., Silage Temperatures: How hot is too hot? Available online at: <http://ag.udel.edu/anfs/faculty/kung/documents/SilageTempsHowHotisTooHot.pdf> , 2009. Visit on January 2017.

LINDGREN, S. et al. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, London, v.36, p.765-774, 1985.

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: [EGF], p. 503-511, 2002.

MAHANNA, B., and L.E CHASE, 2003. Practical applications and solutions to silage problems. In: BUXTON D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, p. 855-895, 2003.

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

MOON, N. J., and L. O. ELY. Identification and properties of yeasts associated with the aerobic deterioration of wheat and alfalfa silages. **Mycopathologia** 69:153–156, 1979.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J. H (Co-ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA,(Agronomy, 42),Cap. 2, p. 31-93, 2003.

SANTOS, M. C.; GOLT, C.; JOERGER, R. D.; et al. Identification of the major yeasts isolated from high moisture corn and corn silages in the United States using genetic and biochemical methods. **Journal of Dairy Science**, p. 1–10, 2017.

SAVOIE, P.; JOFRIET, J. C. Silage storage. In: BUXTON D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, p. 405-468, 2003.

TABACCO, E. et al. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, n. 5, p. 1632-1641, nov. 2009.

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

CAPÍTULO 2: Uso do pH como indicador da deterioração aeróbia de silagens de milho em condições práticas

RESUMO

O milho é a cultura mais utilizada no Brasil na forma de silagem, principalmente por produtores de leite. Porém silagem de milho é particularmente susceptível à deterioração aeróbia quando exposta ao oxigênio. A temperatura da silagem é um parâmetro que pode ser mensurado e relacionado com a deterioração aeróbia, porém o calor gerado na deterioração pode ser confundido com calor de fermentação, sendo assim o pH uma variável que pode vir a ser um melhor parâmetro para detectar deterioração. O objetivo do estudo foi verificar se o pH melhor se correlaciona com a deterioração aeróbia do que a temperatura. Amostras de silagem foram coletadas em vinte e cinco propriedades rurais do Sul de Minas Gerais no período de Novembro de 2015 a Dezembro de 2016. Foram realizadas avaliações de temperatura, densidade e coleta de amostras para composição química, fermentativa e microbiológica em quatro posições no silo: três posições periféricas (PL, PI e PC) coletadas a 200 mm de profundidade, e uma posição no centro do painel do silo (CT) coletada a 400 mm de profundidade do painel do silo. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e vinte e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o recurso PROC ANOVA do programa SAS 9.1. O Coeficiente de correlação de Pearson foi usado por meio do recurso PROC CORR do programa SAS 9.1 para os dados de temperatura, composição química e microbiológica da silagem de milho e também para as diferenças de pH entre PL,PI , PC e CT. O tratamento CT apresentou menor valor de pH e contagens de leveduras, e maior concentração de ácido lático e açúcares frente aos outros tratamentos. O crescimento de leveduras acima de 5 log ufc/g se relacionou com maiores valores de temperatura e pH. Os dados deste trabalho mostram que o pH pode ser útil em detectar o processo de deterioração aeróbia em seu estágio inicial, e pode ser usado em conjunto com a temperatura alertando assim os produtores para o início de uma deterioração.

Palavras-chave: Deterioração aeróbia, Leveduras, Posições periféricas.

ABSTRACT

Corn is the most used crop for silage making on Brazilian dairy farms. However, corn silage is particularly susceptible to aerobic deterioration when exposed to oxygen. The temperature of the silage is a parameter that can be measured and related to the aerobic deterioration, but the heat generated during the fermentation process can be confused with heat of deterioration. Thus, the pH is a variable that may be used as a parameter to detect spoilage. The objective of this study was to verify the relationship between pH and aerobic deterioration on commercial dairy farms. Silage samples were collected at twenty-five properties in the South of Minas Gerais from November 2015 to December 2016. Physical, chemical, microbiological characteristics were measured at four locations at the silo face: 3 at the top (lateral, center, and an intermediate between them) and 1 at the silo core. A completely randomized design with four treatments and twenty-five replications was used. Data were submitted to analysis of variance using the PROC ANOVA of the SAS 9.1. The Pearson correlation coefficient was used using the PROC CORR of the same program. The core treatment had lower pH value and yeast counts, and higher concentration of lactic acid and sugars compared to other treatments. Yeast growth above 5 log cfu/g and was associated with higher temperature and pH values. The data from this study show that pH may be useful in detecting the aerobic deterioration process at its early stage, and can be used in combination with temperature, alerting farmers to the onset of deterioration.

Keywords: Aerobic deterioration, Yeasts, Peripheral areas.

1 INTRODUÇÃO

O milho é a cultura mais utilizada no Brasil na forma de silagem, principalmente por produtores que se dedicam à produção de leite. Ela é considerada adequada para ser ensilada por possuir características favoráveis à fermentação (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

O processo de ensilagem baseia-se na fermentação em condições anaeróbias pelo qual bactérias ácido lácticas (BAL) epifíticas convertem carboidratos solúveis em água (CSA) em ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico. Como resultado, o pH diminui e então a massa de forragem é preservada pela inibição do crescimento de microrganismos deterioradores (PAHLOW et al., 2003).

A silagem de milho é particularmente susceptível à deterioração aeróbia quando a mesma é exposta ao oxigênio no silo ou no cocho (BORREANI E TABACCO, 2010).

O processo de deterioração se inicia por ação de leveduras que são ácido-tolerantes e estão presentes na silagem, e em condições aeróbias aumentam seu crescimento e sobrevivência (JONSSON e PAHLOW, 1984). As leveduras assimilam o lactato ocorrendo aumento do pH e da temperatura, o que permite a sucessão de outros organismos aeróbios na silagem (PAHLOW et al., 2003).

A temperatura da silagem é um parâmetro que pode ser mensurado e relacionado com a deterioração aeróbia, pois sua elevação e sua manutenção ao longo do tempo são reflexos do crescimento de leveduras e fungos filamentosos. Um método proposto por Borreani e Tabacco (2010) utiliza a temperatura do centro da massa de silagem de milho como referência às demais partes do painel que desejam ser avaliadas. Segundo esses autores, quando a temperatura de qualquer ponto da massa é superior à 5 °C em relação ao centro há fortes indícios de início de deterioração.

O processo de fermentação também gera um aumento de temperatura na massa, pois é resultante de um conjunto de reações

bioquímicas, em que alguns microrganismos obtêm energia (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Esse aumento de temperatura ocorre principalmente quando o abastecimento do silo é lento, fato comum no nosso país. Desse modo, a mensuração da temperatura como fator de deterioração pode ser confundida com calor gerado pela fermentação. Portanto, é necessário que outra variável mais acurada frente à temperatura ou associada a ela que possa detectar a deterioração.

O pH é uma variável que pode ser utilizada, pois qualquer alteração pelo consumo de ácido lático pelas leveduras é capaz de ser detectado, ou seja, no caso de silagens de milho onde não há efeito de tamponamento, o pH aumenta quando há o consumo de ácido lático, permitindo o desenvolvimento de alguns microrganismos indesejáveis quando a silagem é exposta ao ar. Desse modo, o objetivo deste estudo foi o de avaliar a variável pH como indicadora de deterioração aeróbia de silagens de milho estocadas em fazendas comerciais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras

As amostras foram coletadas em vinte e cinco propriedades rurais do Sul de Minas Gerais que utilizavam silagem de milho na alimentação dos animais. As coletas foram realizadas no período de Novembro de 2015 a Dezembro de 2016. Em cada propriedade um silo trincheira foi escolhido para retirada das amostras. As fazendas leiteiras visitadas adotavam bom, médio e ruim manejo na produção de silagem para assegurar que não somente silagens de alta qualidade tivessem sido avaliadas.

2.2 Amostragens e Avaliações

A avaliação da temperatura da silagem foi realizada em quatro posições na metade do painel de cada silo, que incluíram três posições no topo do silo denominadas: periférica lateral (PL), situada a 30 cm do topo e a 20 cm da parede, periférica central (PC) localizada a 30 cm do topo e na região central do silo, periférica intermediária (PI) situada entre as posições PL e PC, e uma posição no centro do painel (CT) conforme a Figura 1. Foi utilizado um termômetro acoplado a uma sonda (Dostmann eletronic GmbH, modelo Serie P700, Alemanha). A temperatura nas posições periféricas foram medidas a 200 mm de profundidade, e no centro a temperatura foi medida 400 mm de profundidade. A silagem situada a 400 mm sofre menor interferência do ambiente, e foi considerada como referência (BORREANI e TABACCO, 2010).

Para a análise de densidade as amostras foram coletadas nas mesmas quatro posições em que a temperatura foi aferida. As amostragens foram feitas por meio de uma furadeira elétrica acoplada a uma probe de 46 mm de diâmetro e 227 mm de comprimento (MUCK e HOLMES, 2000). Em seguida, as amostras foram pesadas e seu peso associado ao volume da probe para o cálculo da densidade.

As amostras destinadas a determinação das análises química, fermentativa e microbiológica foram coletadas nas quatro posições no painel do silo, conforme a Figura 1, sendo que, no centro a amostra foi coletada a 400 mm de profundidade. Após as coletas todas as amostras foram imediatamente embaladas e seladas a vácuo.

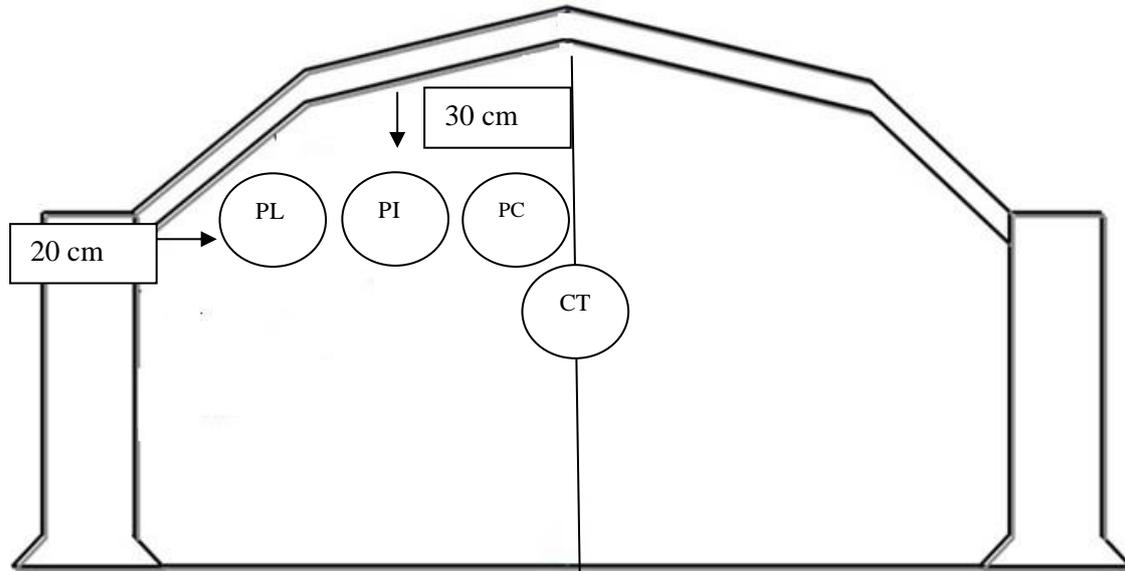


Figura 1 Representação do silo e as posições de amostragem

2.3 Análises Químicas e Microbiológicas

As amostras foram subdivididas em três subamostras. A primeira subamostra foi destinada para a realização das análises químicas. Para determinação da MS, conforme a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1990) foi usada estufa de ventilação forçada à 60 °C por 72 horas. Amostras foram moídas em moinho com peneira de crivo de 1 mm para posterior determinação das cinzas (AOAC, 1990), proteína bruta (PB) (AOAC, 1990), fibra em detergente neutro (FDN), utilizando α -amilase termoestável (VAN SOEST et al., 1991), amido (HALL e MERTENS, 2008), e carboidratos solúveis em água (DUBOIS et al., 1956). A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da FDN (DIVFDN) foram determinadas pelo método proposto por Holden (1999), utilizando o equipamento DAISY II (ANKOM Technology Corp, Fairport, NY, EUA). O fluido ruminal foi coletado via cânula, duas horas após a alimentação matinal. Dois animais foram alimentados com uma dieta contendo 80% de silagem de milho e 20% de concentrado.

A segunda subamostra foi designada para a determinação do pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácidos orgânicos e etanol. O pH e o N-NH₃

foram obtidos por meio de um extrato aquoso preparado com 30 g de amostra e 270 g de água destilada, homogeneizado no aparelho Stomacher (modelo Stomacher® 400, Seward). A mensuração do pH e do N-NH₃ foram feitas por meio de um eletrodo específico, acoplado a um aparelho multiparâmetro (Thermo Scientific Orion Star A214 pH / ISE).

Na determinação dos ácidos orgânicos (lático, acético, málico, succínico, isovalérico, propiônico e butírico) e do etanol e 1,2 propanodiol foi utilizada a cromatografia líquida de alta precisão (Shimadzu LC 10 Ai; Shimadzu Corp., Tokyo, Japão). O extrato da silagem foi obtido após homogeneização no aparelho Stomacher (modelo Stomacher® 400, Seward) durante 4 minutos, de 30 g de amostra fresca e 270 g de água destilada. Dois mililitros de amostra foram alocados em eppendorfs contendo 0,01 ml de ácido sulfúrico 50%, e posteriormente levadas ao laboratório para centrifugação, filtração e injeção. Para ácidos orgânicos foi utilizado o detector de radiação ultravioleta (UV-vis) com comprimento de onda de 210nm e para etanol e 1,2 propanodiol, um detector de índice de refração (RID; 10A SPD-10Ai). O aparelho foi equipado com uma coluna de exclusão de íon (SUPELCO – SUPELCOGEL 8H-5cm-4.8mm) operando a 30 °C com um fluxo de corrida de 0,6ml/min com fase móvel água e ácido sulfúrico 0,005M.

A terceira subamostra foi destinada para a contagem de leveduras e fungos filamentosos. Para isso, um extrato aquoso com 30 g de amostra e 270 g de água peptonada foi preparado e homogeneizado durante 4 minutos, utilizando o aparelho Stomacher (modelo Stomacher® 400, Seward). As contagens foram feitas utilizando a técnica de plaqueamento em superfície com o meio de cultura YGC Ágar (Fluka, Sigma Aldrich Química Brasil LTDA), onde foram preparadas diluições em série e duplicata. As placas de Petri foram incubadas a 28 °C durante três e cinco dias para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente, e posteriormente foi realizada a contagem das colônias, com base em suas características macromorfológicas (TABACCO et al., 2009).

2.4 Delta pH e Delta temperatura

Com relação ao pH e à temperatura, foram determinados os chamados Delta pH (DpH) e Delta Temperatura (DT40), calculados a partir das diferenças dos valores de pH e temperatura das posições periféricas (amostras de 200 mm de profundidade no silo) e do centro (400 mm de profundidade). Esses índices foram utilizados para a visualização da dispersão dos valores de leveduras e de fungos filamentosos (figuras 2 e 3).

2.5 Análise Estatística

O delineamento experimental realizado foi o de blocos casualizados, com quatro tratamentos (posições na face do silo) e vinte e cinco repetições (fazendas), considerando posição como efeito fixo e fazenda como aleatório.

As contagens microbianas foram transformadas em \log_{10} para distribuição normal dos dados. Os dados de composição química, fermentativa e contagem de microrganismos de todos os pontos de cada silo foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o recurso PROC ANOVA do programa SAS 9.1 (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2004) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para avaliar as posições na face do silo. As significâncias foram declaradas quando o valor de P for inferior a 0,05.

O coeficiente de correlação de Pearson foi usado por meio do recurso PROC CORR do programa SAS 9.1 (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2004), para correlacionar dados de temperatura, composição química e microbiológica com DpH das amostras.

3 RESULTADOS

Os valores médios de composição química, característica fermentativa e contagem microbiana do centro e das áreas periféricas são mostrados na Tabela 1. O centro (CT) foi caracterizado pela MS variando de 23,2% a 38,4% com uma média de 32,9% e não apresentou diferença em relação às demais posições PL, PI e PC ($P = 0,8822$). Para as variáveis FDN, cinzas, PB, DIVMS e DIVFDN não houve diferença entre as posições ($P > 0,05$). Para CSA houve diferença ($P < 0,0001$) de CT em relação às três posições periféricas, sendo o maior valor médio o de CT comparado a PL, PI e PC. Em relação ao amido houve diferença entre as posições ($P = 0,0002$), CT apresentou maior média em relação a PL e PI e PC apresentou valor intermediário. Houve diferença nos valores médios de densidade entre os tratamentos ($P < 0,0001$) e CT apresentou o maior valor frente às posições periféricas com média $726,3 \text{ kg/m}^3$ variando de 472 a $1005,7 \text{ kg/m}^3$. Não houve diferença ($P = 0,9293$) para a temperatura das silagens.

Quanto ao perfil fermentativo, CT apresentou menor valor de pH ($P = 0,0002$) e maior valor de ácido láctico ($P = 0,0029$) com médias de 3,81 e 5,11%, respectivamente. Não houve diferença entre os tratamentos para os ácidos: acético, málico, succínico, propiônico e isovalérico ($P > 0,05$). Para CT e PL o ácido butírico apresentou valor abaixo do limite de detecção, chegando ao valor máximo de 1,14% da MS para PI, não havendo diferença entre os tratamentos ($P = 0,5322$). Não houve diferença entre os tratamentos para etanol ($P = 0,7029$), 1,2 propanodiol ($P = 0,1760$) e para a variável N-NH₃ ($P = 0,1043$).

Para a contagem de leveduras, PL apresentou a maior contagem frente às demais posições ($P = 0,0017$), e, para fungos filamentosos não houve diferença entre os tratamentos ($P = 0,1442$).

Tabela 1 Valores médios (variações entre parênteses) de composição química, perfil fermentativo e contagem microbiológica das silagens de milho nas posições periféricas (PL, PI, PC) e no centro (CT) (n=100)

Variável	CT	PL	PI	PC	EPM	P valor
MS (%)	32,9 (23,2 - 38,4)	33,3 (21,4 - 43,7)	32,7 (18,4 - 42,8)	32,9 (23,3 - 39,7)	6,44952	0,8822
FDN (%)	52,0 (42,6 - 62,7)	55,2 (46,6 - 68,1)	55,4 (39,5 - 76,2)	54,9 (43,9 - 73,5)	30,12234	0,1050
Cinzas (%)	3,24 (2,41 - 4,99)	3,63 (2,38 - 6,25)	3,32 (1,87 - 5,12)	3,28 (1,65 - 4,49)	0,294583	0,0541
PB (%)	6,84 (4,61 - 9,43)	7,12 (4,75 - 9,34)	7,21 (4,53 - 9,45)	7,00 (4,51 - 9,85)	0,658748	0,4049
CSA (% MS)	5,07 ^a (1,68 - 8,26)	4,04 ^b (1,53 - 7,60)	3,76 ^b (1,90 - 7,53)	3,80 ^b (1,58 - 7,40)	0,999364	<0,0001
Amido (% MS)	26,3 ^a (10,8 - 38,1)	20,8 ^b (7,81 - 33,9)	21,1 ^b (7,13 - 37,1)	23,3 ^{ab} (6,58 - 35,9)	20,70051	0,0002
DIVMS (%)	62,7 (48,4 - 73,1)	59,9 (48,7 - 67,9)	60,7 (35,9 - 73,1)	62,4 (46,2 - 72,4)	25,00728	0,1596
DIVFDN (%)	46,2 (31,1 - 58,8)	46,7 (21,0 - 73,8)	44,8 (19,2 - 66,2)	43,7 (23,8 - 68,8)	43,90696	0,5908
Densidade (kg /m ³)	726,3 ^a (472 - 1005,7)	508,1 ^b (259,3 - 851)	508,2 ^b (289,7 - 692,3)	473,6 ^b (222,3 - 674,2)	3,71947	<0,0001
Temperatura (°C)	29,3 (24,3 - 35,6)	29,5 (25,6 - 44,4)	29,0 (23,0 - 44,3)	29,0 (22,2 - 44,1)	8,638558	0,9293
pH	3,81 ^b (3,60 - 4,11)	3,94 ^a (3,61 - 4,20)	3,9 ^a (3,70 - 4,08)	3,93 ^a (3,66 - 4,20)	0,011922	0,0002
N-NH ₃ (%N total)	10,2 (4,91 - 20,3)	8,69 (4,24 - 17,0)	9,95 (2,92 - 15,2)	10,3 (5,63 - 19,4)	6,62243	0,1043
Ácido láctico (% MS)	5,11 ^a (0,75 - 14,0)	4,34 ^{ab} (2,14 - 6,14)	2,94 ^b (1,09 - 6,50)	3,41 ^b (1,09 - 9,94)	3,361747	0,0029
Ácido acético (% MS)	0,95 (0,22 - 1,90)	0,79 (0,03 - 1,59)	0,67 (0,08 - 1,57)	0,66 (0,12 - 2,04)	0,16322	0,098
Ácido propiônico (%MS)	0,54 (0 - 1,28)	0,46 (0 - 1,20)	0,47 (0 - 1,64)	0,52 (0 - 1,01)	0,086163	0,7664
Ácido isovalérico (%MS)	0,35 (0 - 1,20)	0,28 (0 - 0,72)	0,28 (0 - 0,83)	0,53 (0 - 1,18)	0,130221	0,1131
Ácido succínico (%MS)	0,17 ^{ab} (0 - 0,85)	0,29 ^a (0 - 1,61)	0,11 ^{ab} (0 - 0,95)	0,09 ^b (0 - 0,43)	0,045693	0,0255
Ácido málico (%MS)	0,09 (0 - 0,32)	0,14 (0 - 0,39)	0,14 (0 - 1,04)	0,12 (0 - 0,59)	0,023942	0,6813
Ácido butírico (%MS)	<0,001	<0,001	0,06 (<0,001 - 1,14)	0,03 (<0,001 - 0,51)	0,020729	0,5322
1,2-propanodiol (% MS)	1,58 (1,26 - 1,49)	1,53 (1,05 - 2,13)	1,33 (0 - 2,32)	1,32 (0 - 1,99)	0,094245	0,1760
Etanol (% MS)	0,54 (0 - 2,48)	0,45 (0 - 1,66)	0,34 (0 - 2,57)	0,46 (0 - 3,39)	0,273278	0,7029
Levedura log (ufc/g)	<2,00 ^b (<2,00 - 6,72)	3,65 ^a (<2,0 - 7,7)	2,37 ^{ab} (2,18 - 6,98)	2,19 ^{ab} (<2,00 - 7,92)	3,921382	0,0017
FF log (ufc/g)	<1,00 (<1,00 - 2,00)	<1,00 (2,30 - 5,40)	<1,00 (2,30 - 5,94)	<1,00 (2,00 - 6,26)	0,779266	0,1442

Dados de composição química e perfil fermentativo são apresentados como % MS; MS: matéria seca; FDN: fibra em detergente neutro; PB: proteína bruta; CSA: carboidratos solúveis em água; DIVMS: digestibilidade *in vitro* da MS, DIVFDN: digestibilidade *in vitro* da FDN; N-NH₃: nitrogênio amoniacal; FF – fungos filamentosos. CT: centro; PL: posição periférica lateral; PI: posição periférica intermediária; PC: posição periférica central.

As médias em uma mesma linha com letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$).

Tabela 2 Coeficiente de correlação de Pearson para composição química e microbiológica das silagens e a diferença de pH entre as silagens das posições periféricas e o centro amostrado a 400 mm de profundidade no silo (DpH) (n=100)

Variável	Densidade	Temperatura	Leveduras	FF	CSA	Ác.Lático	N-NH ₃	Àc. Acético
Temperatura	-0,18 ^{NS}							
Leveduras	-0,41**	0,57**						
Fungos	-0,25*	0,44**	0,39**					
CSA	0,19 ^{NS}	-0,11 ^{NS}	-0,24*	-0,11 ^{NS}				
Ac.Lático	0,34**	0,02 ^{NS}	-0,08 ^{NS}	-0,06 ^{NS}	0,29**			
N-NH₃	0,41**	-0,16 ^{NS}	-0,34**	-0,29**	0,28**	0,34**		
Ac.Acético	0,35**	-0,14 ^{NS}	-0,24*	-0,15 ^{NS}	0,3**	0,45**	0,3**	
DpH	-0,32**	0,31**	0,27**	0,25*	-0,16 ^{NS}	-0,16 ^{NS}	-0,01 ^{NS}	-0,18 ^{NS}

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; NS = $P > 0,05$.

As correlações entre o DpH e composição química e microbiana das amostras de silagem são apresentados na Tabela 2. O DpH mostrou correlação positiva com temperatura, levedura e fungos filamentosos, enquanto que, foi negativamente correlacionado com densidade. A temperatura das silagens também mostrou correlação positiva com fungos filamentosos e leveduras, e com o DpH. Outras variáveis da silagem foram intercorrelacionadas de várias maneiras.

As relações entre DT40 e DpH com contagem de leveduras e fungos filamentosos das posições periféricas são mostradas nas Figuras 2 e 3. As áreas periféricas foram divididas em três grupos: aquela com DpH inferior a 0,1 e um DT40 inferior a 3,5 °C (35%), outra com DpH maior que 0,1 e DT40 menor que 3,5 °C (50%), e finalmente a com DpH superior a 0,1 e um DT40 Superior a 3,5 °C (15%). Dentro desse último grupo, 91% das amostras possuíam DT40 maior que 5 °C e contagem de leveduras superior a 5 log ufc/g.

As amostras das posições periféricas com contagem de leveduras maior que 5 log ufc/g (29%) foram divididas com dois grupos, um com DpH maior que 0,1 (73%) e outro com DpH menor que 0,1 (27%).

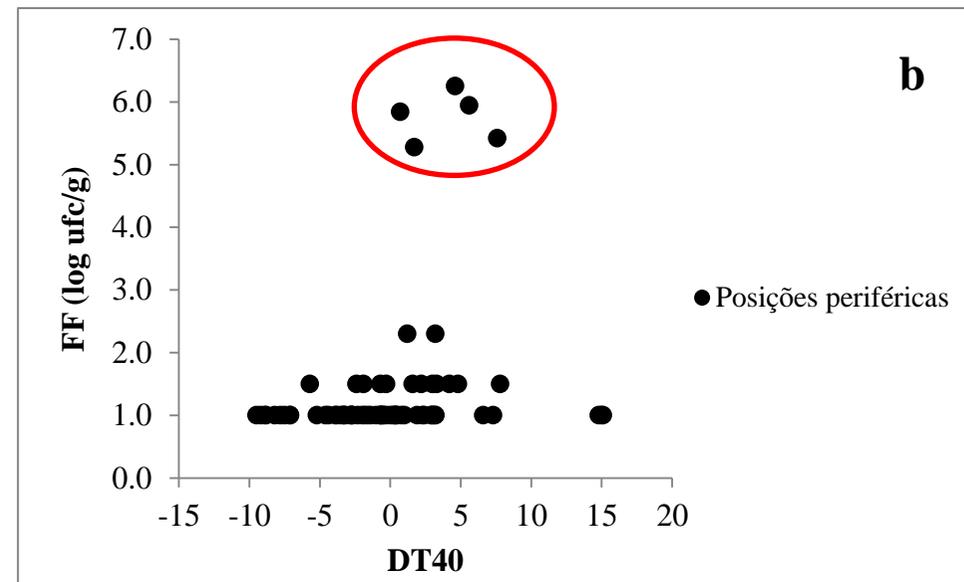
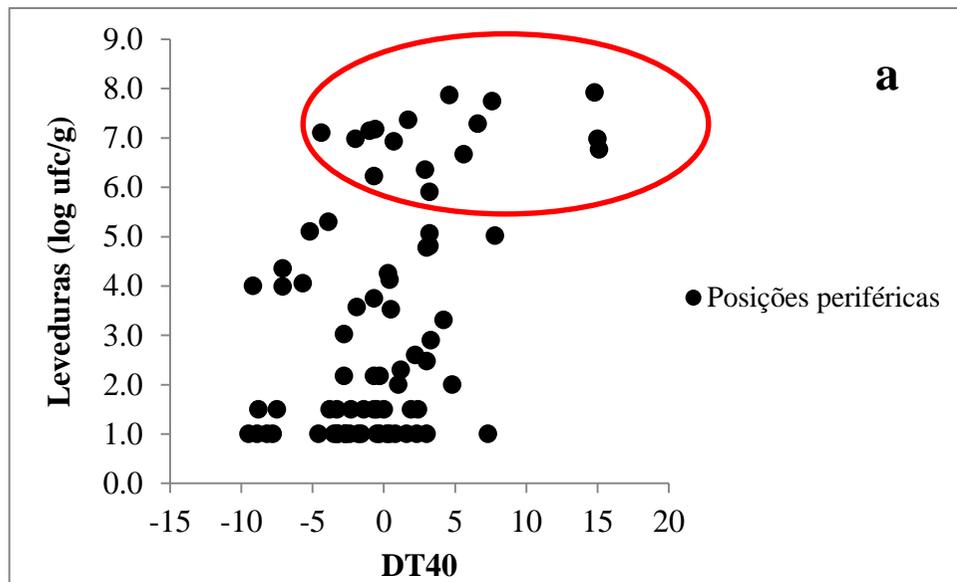


Figura 2 Contagem de leveduras (a) e fungos filamentosos (FF) (b) das posições periféricas em relação à diferença de temperatura entre silagens das posições periféricas e o centro localizado a 400 mm de profundidade (DT40). As amostras agrupadas no círculo são silagens mal conservadas.

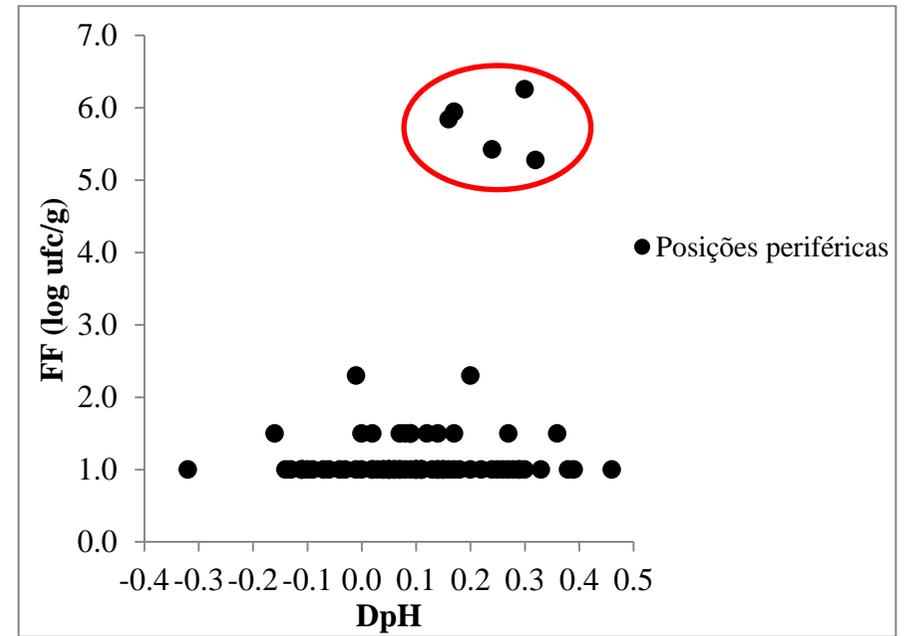
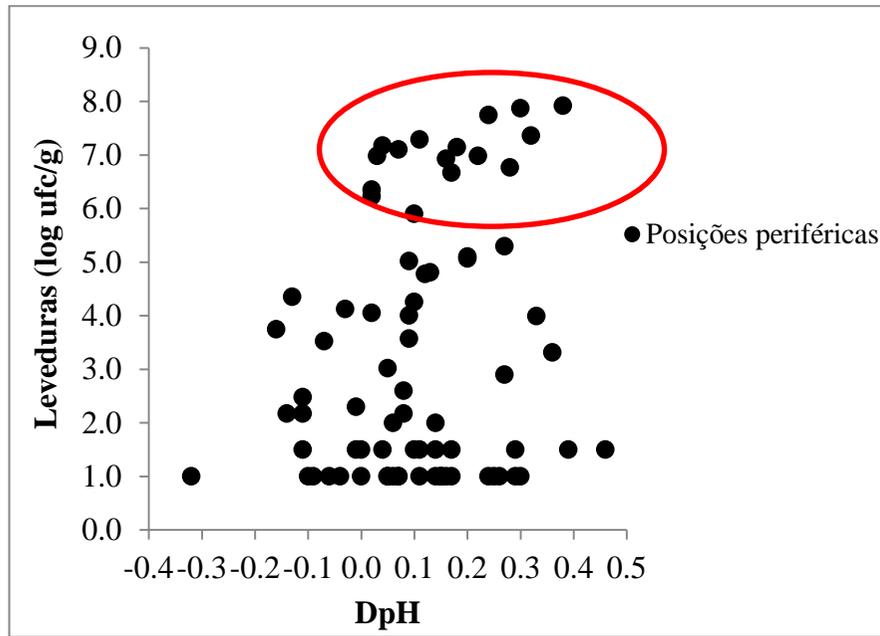


Figura 3 Contagem de leveduras (a) e fungos filamentosos (FF) (b) das posições periféricas em relação à diferença de pH entre as silagens das posições periféricas e o centro localizado a 400 mm de profundidade (DpH). As amostras agrupadas no círculo são silagens mal conservadas.

4 DISCUSSÃO

As fazendas visitadas tinham características muito diferentes entre si em se tratando do manejo do silo adotado. Informações a respeito da fase de abastecimento do silo tais como: em quantos dias o silo foi abastecido e vedado, informações da largura do silo, e aquelas relacionadas com desabastecimento, (forma de retirada da silagem, e taxa de retirada por semana), todas essas e outras características podem ter influência na qualidade final da silagem e justifica as variações nos valores da composição das silagens entre fazendas para uma mesma posição no silo.

Há muito tempo são conhecidos os efeitos deletérios do ar sobre a silagem. As primeiras metodologias desenvolvidas para medir a estabilidade aeróbia em escala de laboratório foram propostas por pesquisadores alemães na década de 70 (PAHLOW; MUCK, 2009). Segundo Borreani e Tabacco (2010), muitas subseqüentes metodologias foram desenvolvidas, como a de Honig (1990), que apresentou um método baseado no monitoramento do aumento da temperatura da silagem em recipientes isolados. Outra metodologia fundamentada na mensuração do CO₂ com titulação por KOH foi desenvolvida por Ashbell et al. (1991). A padronização dos métodos veio com o trabalho de Ranjit e Kung (2000), usado hoje como referência para estabelecer trabalhos com estabilidade aeróbia sob diferentes condições.

O processo de oxidação é acompanhado por um aumento de calor, portanto o aumento da temperatura pode ser um indicador da extensão e intensidade da deterioração aeróbia tanto em condições experimentais como práticas.

Ruppel et al., (1995) mensuraram as temperaturas durante a fase de desabastecimento em profundidades de 200 mm em várias posições ao longo da área do painel, bem como a temperatura ambiente. Eles então definiram um índice de aquecimento relacionado com a deterioração aeróbia. O problema desse método é que a temperatura ambiente nem sempre é uma boa referência, principalmente em países tropicais onde as temperaturas são mais

altas. Borreani e Tabacco (2010) usaram esse índice relacionado à temperatura ambiente como referência, mas também usaram o chamado D_{tref} que seria a diferença da temperatura das silagens do topo do silo medidas a 200 mm e do centro medido a 400 mm de profundidade, justificando o centro a 400 mm como referência, pois há menos influência das variações de temperatura que ocorrem no ambiente. Esses autores usaram o D_{tref} acima de 3,5 °C e 5 °C para dividir as fazendas em grupos e acima dessas temperaturas as silagens apresentavam deterioração aeróbia.

No presente estudo, além do índice DT40 tendo a temperatura do centro como referência, houve a determinação de outro índice, o D_{pH} , que segue o mesmo raciocínio, porém representa as diferenças de pH de cada amostra das posições PL, PI e PC medidas a 200 mm de profundidade e das amostras de CT medidas a 400 mm de profundidade. Esses índices foram criados para poder indicar que está ocorrendo início de deterioração aeróbia em silagens do topo, a partir de um valor específico. Na figura 2, a partir de um DT40 acima de 5 °C, se encontravam fazendas com alta contagem de leveduras e fungos filamentosos, e na figura 3, no caso do pH, em um D_{pH} acima de 0,2, se observa o maior número de fazendas com altas contagens de leveduras e fungos filamentosos.

As leveduras são os principais microrganismos responsáveis pelo início da deterioração aeróbia de silagens quando esta é exposta ao ambiente (PAHLOW et al., 2003). A maioria das silagens é exposta ao oxigênio durante o período conservação, devido à permeabilidade da lona ao oxigênio e as dificuldades de realizar uma vedação adequada do silo, ou durante a fase de desabastecimento, devido à baixa remoção da silagem e o inadequado manejo do painel (BORREANI et al., 2012). As áreas periféricas dos silos podem apresentar alta contagem de leveduras, pela susceptibilidade destas zonas à entrada de O_2 (PAHLOW et al., 2003; VISSERS et al., 2007).

No presente trabalho houve fazendas com crescimento de leveduras (maior que 5 log ufc/g) e com baixo teor de ácido lático, e conseqüentemente valores de pH acima de 4. Porém houve casos de crescimento de leveduras e

com um não aumento de pH, podendo ser justificado por presença de grupos de leveduras consumidoras de açúcares e não de ácido láctico, como identificado no estudo de Santos et al. (2017).

O ácido láctico e os CSA são as principais fontes de energia para as leveduras. Quando as silagens são bem fermentadas, o principal produto oxidado é o ácido láctico (WEINBERG et al., 2001). Porém a população de leveduras associada à deterioração de silagens pode ser dividida em dois grupos. Um grupo com capacidade de fermentar açúcares, e outro grupo com alta capacidade respiratória e afinidade pelo ácido láctico (SANTOS et al., 2017). Os teores de ácido láctico e CSA variaram muito nas amostras do topo (PL, PI e PC), com valores de 1,09 a 9,94% da MS para ácido láctico, e 1,53 a 7,60% da MS para CSA.

Em algumas fazendas, não houve crescimento de leveduras em PL, PI e PC. Uma justificativa seria presença do ácido acético, presente em todos os tratamentos, e que pode ser proveniente do metabolismo de bactérias heterofermentativas. O aumento da concentração deste ácido é fator determinante para a redução da atividade de leveduras durante a fase de utilização da silagem. A presença do ácido propiônico também se relaciona com a inibição do crescimento de leveduras, e também esteve presente em todos os tratamentos. Segundo Moon (1983), o ácido propiônico em combinação com o ácido acético, apresenta efeito sinérgico capaz de reduzir o crescimento de leveduras e fungos filamentosos. Os ácidos propiônico e acético chegaram a valores máximos de 2,04% da MS e 1,64% da MS respectivamente em amostras do topo.

No presente estudo, não houve crescimento de fungos filamentosos no CT e em diversas fazendas nas posições PL, PI e PC. A posição de amostragem e mensuração das temperaturas, (30 cm abaixo do topo de cada silo) excluía partes visivelmente deterioradas, e em diversas fazendas essa camada com fungos filamentosos visíveis era bem pequena.

5 CONCLUSÃO

Os dados deste trabalho mostram que o aumento, em conjunto, da temperatura e do pH em silagens de milho em condições de fazenda é resultado da atividade de microrganismos deterioradores. As alterações dessas variáveis tem aplicação prática e são úteis em detectar o processo de deterioração aeróbia em seu estágio inicial, o que auxilia os produtores a melhorarem o manejo de alimentação pelo não fornecimento de alimento deteriorado.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists**. 15th ed. Arlington. 1990.

ASHBELL, G. et al. A simple system to study the aerobic deterioration of silages. **Canadian Agricultural Engineering**, Ottawa, v. 33, p. 391-393, 1991.

BORREANI, G.; TABACCO, E. Effect of silo management factors on aerobic stability and extent of spoilage in farm maize silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012, Hameenlinna. **Proceedings...**Hameenlinna, Finland: MTT Agrifood Research Finland University of Helsinki,. p. 71-72, 2012.

BORREANI, G.; TABACCO, E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of dairy science**. v. 93, n. 6, 2010.

DUBOIS, M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS AND F. SMITH, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

HOLDEN L.A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science*, 82, 1791–1794, 1999.

HONIG, H. Evaluation of aerobic stability. In: EUROBAC CONFERENCE, Swedish. **Proceedings...** Swedish: Swedish University of Agriculture Sciences, Sci., p. 76- 82, 1990.

JONSSON. A., and G. PAHLOW, Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures, **Anim. Res.Develop**, 20:7-22. 1984.

McDONALD. P., HENDERSON. A., R.. HERON. S. J. E, **Biochemistry of silage**, 2. Ed, Marlow:ChalcombePublication. 1991.

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

MUCK. R. E.; HOLMES. B. J, Factors affecting bunker silo densities, **Applied Engineering in Agriculture**, Saint Joseph. v. 16, n. 6, 2000.

MUCK. R.E; MOSER.L.E; PITT. R E., Postharvest factors affecting ensiling, In : BUXTON. D.R.; MUCK. R.; HARRISON. J.R. (Ed.),**Silage Science and technology**, Madison: American Society of Agronomy, 2003.

PAHLOW. G.; MUCK. R.E.; DRIEHUIS. F.; et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK. R.E.; HARRISON. J.H, **Silage science and technology**, Madison: ASA. CSSA, SSSA. 2003.

PAHLOW, G.; MUCK, R. E. Managing for improved aerobic stability. In:INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison, WI. **Proceedings...** Madison, WI: University of Wisconsin, . p. 77-90, 2009.

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

RUPPEL, K. A. et al. Bunker silo management and its relationship to forage preservation on dairy farms. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 78, n. 1, p. 141-153, 1995.

SANTOS, M. C.; GOLT, C.; JOERGER, R. D.; et al. Identification of the major yeasts isolated from high moisture corn and corn silages in the United States using genetic and biochemical methods. **Journal of Dairy Science**, p. 1–10, 2017.

SAS Institute, SAS/STAT 9.1 User's Guide, SAS Institute Inc.. Cary, NC, 1–5121, 2004.

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

TABACCO. E. et al., Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants, **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.107, n.5, 2009.

VISSERS, M. M. M. et al. Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 2, p. 928-936, 2007.

WEINBERG, Z. G. et al. The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 561-566, 2001.