



**NAIARA CAIXETA DA SILVA**

**ADITIVOS COMO CONTROLADORES DA  
DETERIORAÇÃO AERÓBIA EM SILAGEM DE  
MILHO NA REGIÃO PERIFÉRICA DE SILOS  
TRINCHEIRA**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**NAIARA CAIXETA DA SILVA**

**ADITIVOS COMO CONTROLADORES DA DETERIORAÇÃO  
AERÓBIA EM SILAGEM DE MILHO NA REGIÃO PERIFÉRICA DE  
SILOS TRINCHEIRA**

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

Prof. Thiago Fernandes Bernardes

**LAVRAS – MG**

**2013**

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

Silva, Naiara Caixeta da.

Aditivos como controladores da deterioração aeróbia em silagem  
de milho na região periférica de silos trincheira / Naiara Caixeta da  
Silva. – Lavras : UFLA, 2013.

69 p. : il.

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

Orientador: Thiago Fernandes Bernardes.

Bibliografia.

1. *Lactobacillus buchneri*. 2. Estabilidade aeróbia. 3. Benzoato de  
sódio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.08552

**NAIARA CAIXETA DA SILVA**

**ADITIVOS COMO CONTROLADORES DA DETERIORAÇÃO  
AERÓBIA EM SILAGEM DE MILHO NA REGIÃO PERIFÉRICA DE  
SILOS TRINCHEIRA**

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 25 de fevereiro de 2013

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila - UFLA

Dr. Gustavo Rezende Siqueira - APTA/Colina

Dr. Ricardo Andrade Reis - FCAV/UNESP

Prof. Thiago Fernandes Bernardes

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2013**

*Ao meu amado pai, José Carlos Caixeta (in memoriam), por todo amor e pelo exemplo que me fez seguir esta profissão. À minha mãezinha, Sebastiana Maria Caixeta Silva, por todo carinho e por me acolher em todos os momentos.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder a graça de completar mais esta etapa dos meus estudos.

Aos meus amados pais, José Carlos (*in memoriam*) e Sebastiana, pelo ensinamento, pela formação moral, por todo amor, incentivo, carinho e por estar ao meu lado em todas as dificuldades.

Ao meu irmão querido pela amizade, incentivo e companheirismo.

Ao meu orientador, Prof. Thiago Fernandes Bernardes, pela valiosa contribuição para a realização deste sonho, pela paciência, confiança e orientação.

Aos colegas do núcleo de estudos NEFOR, por todo o aprendizado, pela ajuda na condução do experimento, pela amizade e pelo acolhimento.

A todos os núcleos de estudos, GERE e GMAB que, de alguma forma, estiveram envolvidos neste projeto.

Aos velhos amigos que sempre rezavam pela realização deste sonho, pelo carinho e palavras de consolo.

Aos novos amigos, pelos momentos de alegria e incentivo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia (DZO) pela oportunidade de cursar o mestrado.

A cada um dos funcionários do DZO pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

Aos meus padrinhos, Sinval, Gizette e Neli, por todas as orações e pelo enorme carinho.

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>8</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>A silagem de milho.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Deterioração aeróbia de silagens.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.1</b>	<b>A temperatura ambiente.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Principais microrganismos envolvidos no processo de deterioração...17</b>	
<b>2.2.3</b>	<b>Deterioração em áreas periféricas de silos horizontais.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Parâmetros que indicam deterioração aeróbia em silagens.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Riscos envolvendo a deterioração aeróbia de silagens.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Aditivos usados no controle de deterioração aeróbia em silagens .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Aditivos biológicos.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Aditivos químicos.....</b>	<b>29</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>
	<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>39</b>
	<b>ARTIGO: Aditivos como controladores da deterioração aeróbia em silagem de milho na região periférica de silo trincheira.....</b>	<b>39</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

## RESUMO

Em regiões de clima tropical o processo de deterioração aeróbia é mais intenso, podendo ocorrer de forma grave em áreas periféricas dos silos horizontais. Portanto, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito de duas cepas de *Lactobacillus buchneri* (comercial e indígena) e do benzoato de sódio no controle da estabilidade aeróbia em silagens de milho. Foram conduzidos dois experimentos onde foram testados os seguintes tratamentos: controle (C); *L. buchneri* cepa comercial CNCM I-4323 (LBC) e *L. buchneri* (NCBI HM162412.1) cepa indígena proveniente do Laboratório de Microbiologia da UFPA (LBI), na concentração de  $1 \times 10^6$  ufc g<sup>-1</sup> de forragem fresca; benzoato de sódio (SB) na concentração de 0,2% da forragem fresca. O experimento 1 foi realizado em silos experimentais, em um delineamento inteiramente casualizado e o experimento 2 em silo de trincheira com aplicação dos tratamentos no topo em um delineamento em blocos casualizados. Ambos foram analisados usando o recurso MIXED GLM do programa SAS. O LBI apresentou menor concentração de ácido lático ( $P < 0,05$ ) que SB, maior concentração de ácido acético ( $P < 0,05$ ) que o C, que resultou em um pH mais elevado ( $P < 0,05$ ) que as demais silagens (experimento 1). Foi observada tendência ( $P = 0,069$ ) de diminuição da contagem de leveduras no experimento 1 quando o SB foi aplicado. Em ambos os experimentos o SB proporcionou aumento na estabilidade aeróbia ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos. As silagens tratadas com SB apresentaram maior recuperação de carboidratos solúveis em água (CSA) ( $P < 0,05$ ) e menores perdas de MS (PMS) ( $P < 0,05$ ) que C, LBC e LBI, sendo que no experimento 2 as perdas foram semelhantes aos do centro do silo trincheira. O SB foi o mais eficiente em conservar os nutrientes e em manter a estabilidade aeróbia da silagem.

Palavras-chave: Benzoato de sódio. Estabilidade aeróbia. *Lactobacillus buchneri*.

## ABSTRACT

In warm climates, the aerobic stability of silage is a very important factor in determining its quality. Thus, the objective of this study was to evaluate two *Lactobacillus buchneri* strains (a commercial product and an indigenous specie) and sodium benzoate in improving aerobic stability of corn silage in laboratorial (experiment 1) and field conditions (experiment 2). For both experiments a corn hybrid was grown at University of Lavras (21° 14' S; 45° 00' W) and harvested at 50% milk line stage (36.8% DM). Chopped forage was treated with 1) deionized water (CON); 2) a commercial *L. buchneri* (CLB; strain CNCM I-4323); 3) an indigenous *L. buchneri* (ILB; NCBI HM162412.1), which was isolated from tropical forages; or 4) sodium benzoate at 0.2% (SB). Both inocula were applied at a rate of  $1 \times 10^6$  cfu of bacteria  $g^{-1}$  of forage. In experiment 1, five replicates of each treatment were ensiled in 15-L plastic jars for 103 d. Chemical composition, microbial counts and aerobic stability were assessed. In experiment 2, the upper layer of the bunker silo was divided into four blocks where the treatments were applied. Plastic net bags with fresh forage were buried in the upper layer and in the center of the bunker. After 116 d of conservation, the bags were weighed to determine DM losses and the silages were analyzed for the chemical and microbial characteristics. In experiment 1, silages inoculated with ILB had greater pH value (4.05) than other treatments ( $P < 0.05$ ). Acetate was higher in ILB silages (0.85% DM,  $P < 0.05$ ) compared with CON silages (0.36% DM), and CLB and SB silages showed intermediate concentrations (0.67 and 0.48%, respectively). SB silages showed higher lactic acid concentration (5.86% DM,  $P < 0.05$ ) than ILB silages (2.17% DM), and CON and CLB silages had intermediate values. The number of yeasts and molds was similar among treatments. However, SB tended to affect yeasts number ( $P = 0.069$ ). In experiment 2, SB silages had more residual water-soluble carbohydrates than other silages ( $P < 0.05$ ) and lower concentration of acetic, propionic and butyric acids. SB was also effective in reducing DM losses during storage among treatments. SB silages differed in aerobic stability and aerobic deterioration than other silages. SB was the most effective additive, producing well-fermented silage and a long aerobic stability.

Keywords: Aerobic stability. *Lactobacillus buchneri*. Sodium benzoate.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A ensilagem é um método de conservação de forragens onde as bactérias ácido lácticas (BAL), em condições de anaeróbias, metabolizam carboidratos solúveis em ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático, que promove a redução do pH da massa, conservando seus nutrientes. Para que este processo ocorra rapidamente, evitando-se assim proteólise e fermentações indesejadas, é ideal que a cultura apresente teores adequados de matéria seca (MS), alto conteúdo de carboidratos solúveis em água (CSA) e baixo poder tamponante (WOOLFORD, 1984). Algumas culturas, como o milho, apresentam todas estas características e, quando submetidas ao processo de ensilagem, com boas práticas de manejo, geram poucos problemas durante o processo fermentativo. Contudo, silagens adequadamente fermentadas e com alto valor nutricional são mais susceptíveis ao fenômeno da deterioração aeróbia (MUCK; MOSER; PITT, 2003).

O processo de deterioração ocorre, quando a massa ensilada entra em contato com o oxigênio, seja durante a estocagem ou na etapa de desabastecimento. Desse modo, as zonas periféricas de silos horizontais (trincheira ou superfície) são as mais afetadas (BORREANI; TABACCO; CAVALLARIN, 2007). O fenômeno se inicia pela ação de uma sucessão de gêneros de leveduras, muitos ácidos tolerantes, que vão utilizar o ácido lático e os CSA residuais como substrato. Desse modo, ocorrerá aumento do pH da massa, dando oportunidade para outros microrganismos aeróbios, menos tolerantes ao baixo pH, desenvolverem-se (PAHLOW et al., 2003). Em ambientes de clima tropical, a atenção quanto às perdas causadas pela deterioração aeróbia deve ser redobrada, pois altas temperaturas favorecem o crescimento dos microrganismos espoliadores (BERNARDES; ADESOGAN, 2012).

A deterioração aeróbia das silagens gera perdas de MS de 10 a 20%, podendo chegar a 40% (WOODFORD, 1990), reduz sua aceitabilidade pelo animal e o valor nutritivo da forragem (BOLSEN; WHITLOCK; URIARTE-ARCHUNDIA, 2002). Estudos demonstraram que o consumo de silagem deteriorada resulta em menor digestibilidade de seus componentes orgânicos, menor retenção de N e decréscimo da disponibilidade de energia (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991) e, também, uma alta concentração de FDN e FDA quando comparados a uma silagem normal (QUEIROZ et al., 2012; WEINBERG et al., 2011). Contudo, as preocupações com este fenômeno vão muito além. O desenvolvimento de microrganismos patogênicos, como alguns gêneros de bactérias (*Bacillus*, *Clostridium* e *Listeria*) e alguns fungos filamentosos pode influenciar nos aspectos ligados à sanidade da silagem (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002). A ingestão de micotoxinas, provenientes de fungos filamentosos presentes em silagens deterioradas pode predispor vacas a reduzir a ingestão de MS, sua performance e causar vários problemas reprodutivos, além do risco de transferência para os produtos de origem animal e, conseqüentemente, risco à saúde humana (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK, 2000).

Melhorias nas práticas de manejo com o objetivo de prevenir a deterioração aeróbia de silagens vêm sendo estudadas. A escolha do plástico que vai cobrir o silo, o aumento da compactação da massa, rápida progressão no desabastecimento e até mesmo o uso de pesos sobre a lona plástica podem ajudar a evitar ou diminuir as perdas por deterioração aeróbia. Entretanto, os maiores esforços se concentram em encontrar adequados aditivos, sejam eles químicos ou biológicos capazes de inibir o crescimento de microrganismos espoliadores (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

Portando, este trabalho avalia estratégias de manejo na ensilagem baseada na aplicação no topo da massa de dois aditivos biológicos e um aditivo

químico, objetivando o controle da deterioração aeróbia em áreas periféricas de silo trincheira.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A silagem de milho**

A silagem de milho é uma importante fonte de energia na dieta de bovinos leiteiros no Brasil, em especial no Estado de Minas Gerais, pois este ocupa posição de destaque na cadeia produtiva do leite, sendo o maior produtor da Federação (ANUALPEC, 2012). Na maior bacia leiteira do país, em um levantamento feito pela Fundação ABC, a silagem de milho foi usada em 100% das fazendas cadastradas no Concurso de Silagem, realizado pelo órgão, em pelo menos uma época do ano (CARVALHO; BUENO; ABRAÃO, 2010). No levantamento das práticas de produção e uso de silagens em fazendas produtoras de leite no Brasil, realizado em 2012, mais de 50% dos produtores responderam que o milho é a planta forrageira utilizada para produção de silagem (BERNARDES, 2012).

O milho tem sido uma das culturas predominantes para a produção de silagem, principalmente em regiões onde esta espécie é bem adaptada. Isso porque o milho reúne características positivas como alta ensilabilidade, elevado potencial de produção de MS, elevado valor nutritivo (ALLEN; COORS; ROTH, 2003). O milho também apresenta flexibilidade quanto ao uso, podendo-se fazer silagem de planta inteira ou dos grãos (BERNARDES; MORAIS; SILVA, 2012).

Entretanto, a silagem de milho é, particularmente, suscetível à deterioração aeróbia, quando exposta ao ambiente, principalmente em ambientes de clima quente (ASHBELL et al., 2002; BERNARDES; ADESOGAN, 2012). A alta eficiência da fermentação, do tipo homolática, no processo fermentativo

do milho permite uma rápida produção de ácido láctico, com consequente declínio do pH, por uma via que permite elevada recuperação de energia e MS. Embora este perfil de fermentação seja desejado, nem sempre evita a deterioração da silagem após a abertura (MUCK; MOSER; PITT, 2003). Silagens com adequado padrão fermentativo apresentam altos teores de ácido láctico e CSA remanescentes, que são utilizados como substrato preferencial para o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, após a abertura do silo, além de apresentarem baixa quantidade de produtos inibidores de microrganismos deterioradores, como o ácido acético (TABACCO et al., 2009). A combinação destes fatores pode levar a uma deterioração mais rápida após a abertura do silo ou mesmo durante o armazenamento, caso haja o contato com o O<sub>2</sub>.

## **2.2 Deterioração aeróbia de silagens**

A silagem é definida por Woolford (1984) como sendo o produto formado, quando culturas com alta concentração de umidade, sujeitas à ação de microrganismos deterioradores, são armazenados de forma anaeróbia. Três fatores são apontados por Wilkinson, Bolsen e Lin (2003) como sendo importantes para uma adequada ensilagem por impactarem diretamente o processo fermentativo: a cultura utilizada, a umidade e a eliminação do oxigênio.

A anaerobiose é determinante para o processo de ensilagem. O contato com o ar pode ocorrer tanto durante o enchimento do silo, quanto no armazenamento do material, por falhas no selamento, quanto na etapa de utilização da silagem. A penetração de oxigênio na massa leva ao crescimento de microrganismos aeróbios, resultando na deterioração aeróbia, perdas de MS, riscos de contaminações por microrganismos patogênicos e produção de micotoxinas (HONIG, 1991). A deterioração pode ser afetada por diversos

fatores durante a etapa de conservação e a utilização. Muitos deles estão relacionados ao manejo durante a ensilagem como: concentração de MS da cultura, tamanho de partícula, taxa de enchimento do silo, compactação, densidade, selamento (penetração de O<sub>2</sub>) e uso de aditivos (população de microrganismos). Outros, como a taxa de retirada diária do painel, estão relacionados com manejo de abertura (BORREANI; TABACCO, 2012). Todos estes fatores têm em comum que, em maior ou menor grau, podem ser controlados com estratégias de manejo. Apenas um fator não é passível de controle, a temperatura ambiente (ASHBELL et al., 2002).

### **2.2.1 A temperatura ambiente**

A fermentação da silagem envolve a ação de microrganismos e atividade enzimática. O crescimento dos microrganismos é fortemente influenciado pela temperatura. As BAL podem sobreviver em uma faixa de temperatura que varia de 5 a 50°C, assim como a temperatura de crescimento ótima para as diferentes BAL é muito variada (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Weinberg et al. (2001) relataram que a atividade crescimento do *Lactobacillus plantarum* foi mais intensa a 25°C que a 41°C, e o oposto ocorreu para o *L. amylovorus*, em silagens de trigo, indicando que o sucesso da inoculação em clima tropical pode depender da habilidade do microrganismo inoculado de crescer em temperaturas mais elevadas.

O pH da silagem de milho pode apresentar valores menores quando submetidos a temperaturas mais baixas durante o armazenamento. Quando o ambiente apresenta altas temperaturas (37°C) há um menor contagem de BAL, tendo como consequência menor quantidade de ácido lático e pH mais alto, que indica um pior perfil fermentativo e aumento das perdas (WEINBERG et al., 2001). Maior quantidade de nitrogênio amoniacal também foi encontrada,

indicando alta proteólise. Em silagem de trigo também foi observado menor teor de CSA residual em silagens expostas a temperaturas mais altas durante o período de estocagem (WEINBERG et al., 2001).

A estabilidade aeróbia também pode ser influenciada pela temperatura ambiente, especialmente na face do silo que está continuamente exposta. Ashbell et al. (2002), estudando a influência da temperatura sobre a estabilidade aeróbia, observaram que silagens de milho apresentavam valores mais elevados de pH e decréscimo dos ácidos láctico e acético no material exposto ao ar que permaneceu sobre temperatura de 20 e 30°C, em detrimento das silagens que permaneceram a 10 e 40°C. Maior contagem de leveduras também foi observada em temperatura de 30°C. No geral, a quantidade de CO<sub>2</sub> produzido na silagem exposta ao ar em temperatura de 30°C foi maior, sendo este um indicativo de alta proliferação de microrganismos deterioradores. Estudos realizados por Weinberg et al. (2001), também, indicam que silagens de trigo estocadas à temperatura de 41°C estão mais susceptíveis à deterioração aeróbia, quando comparadas à estocagem a 24°C, quando as temperaturas no ensaio de estabilidade foram altas (33°C).

Diante da impossibilidade de controlar a temperatura ambiente em condições de campo e das altas temperaturas de estocagem às quais as silagem estão expostas em regiões tropicais, como o Brasil, tornam-se imprescindíveis cuidados especiais com as práticas de manejo na ensilagem, a fim de reduzir as chances de crescimento de microrganismos deterioradores.

### **2.2.2 Principais microrganismos envolvidos no processo de deterioração**

#### **Leveduras**

As leveduras são fungos unicelulares, a maioria é estritamente aeróbia, entretanto algumas podem crescer em ambientes anaeróbios, obtendo energia

por meio da fermentação de açúcares (espécies fermentadoras) (PAHLOW et al., 2003). Imediatamente após a ensilagem, as leveduras podem competir por substrato, mas sofrem gradual decréscimo durante os períodos subsequentes. A inibição das leveduras vai depender de diversos fatores tais como pH, grau de anaerobiose e ácidos orgânicos. A presença de O<sub>2</sub> pode estimular a sobrevivência de leveduras, portanto as áreas periféricas dos silos podem apresentar alta contagem dessas espécies e até mesmo apresentar processos de deterioração, ainda, durante a estocagem, pela susceptibilidade destas zonas à entrada de O<sub>2</sub> (PAHLOW et al., 2003; VISSERS et al., 2007).

Algumas leveduras podem crescer em ambientes com pH de 3 a 8 e temperatura variando de 0 a 37°C, sendo o principal microrganismo responsável pelo início do processo de deterioração (WOOLFORD, 1990). Muitas espécies de leveduras crescem em pH relativamente baixo. Isso, aliado à penetração do O<sub>2</sub> na face do silo no momento da sua utilização, desencadeia um intenso processo de multiplicação das leveduras. Algumas leveduras utilizam o lactato e os açúcares residuais como substrato, além de outros ácidos orgânicos, o que leva a um aumento do pH (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Com isso o ambiente fica favorável ao crescimento de microrganismos oportunistas. As leveduras, em geral, têm um ótimo de crescimento à temperatura de até 40°C. Acima de 45°C o número de leveduras tende a baixar, ocorrendo o crescimento de outros microrganismos, tais como, fungos filamentosos, *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium* e enterobacterias (TABACCO et al., 2009).

### **Fungos filamentosos**

Os fungos filamentosos, também conhecidos como mofos, são constituídos por colônias multicelulares filamentosas. Sua presença é indesejável, uma vez que não quebram somente açúcares e ácido lático pela via normal da respiração, mas também hidrolisam e metabolizam celulose e outros

componentes da parede celular (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Assim como as leveduras, os fungos filamentosos estão associados à deterioração aeróbia de silagens. Eles se desenvolvem em uma ampla gama de temperatura variando de 10 a 40°C, entretanto possuem como temperatura ótima 25 a 35°C. Seu pH ótimo de crescimento é acima de 5, por isso considera-se que o crescimento de fungos filamentosos se dá em uma fase mais tardia de deterioração, depois da ação das leveduras. Observam-se dois picos de temperatura, quando se estuda deterioração, o primeiro é atribuído à atividade de leveduras e o segundo a de fungos filamentosos (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Os principais gêneros encontrados em silagens são: *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Byssochlamys*, *Arthrimum*, *Geotrichum* e *Monascus*. A importância destes fungos filamentosos não está associada apenas às perdas de MS e à redução da aceitabilidade e do valor nutritivo da silagem. Alguns deles produzem substâncias denominada micotoxinas, as quais afetam a qualidade higiênica das silagens (PAHLOW et al., 2003).

### **2.2.3 Deterioração em áreas periféricas de silos horizontais**

Os silos horizontais são basicamente de dois tipos: a) silo de superfície, onde são formadas pilhas de forragem sobre o solo sem estrutura de paredes nas laterais, cobertos com filme plástico; b) silo trincheira, com paredes laterais de alvenaria, pré-moldado ou escavado na terra, aproveitando o desnível da área, onde é depositada a forragem, compactada e coberta com lona plástica (SAVOIE; JOFRIET, 2003). Estes tipos de silos estão entre os mais populares no Brasil pelas suas facilidades de manejo, baixo custo e flexibilidade quanto ao local de construção. Em um levantamento das práticas de produção e uso de silagens em fazendas produtoras de leite no Brasil, 60% dos produtores

responderam que utilizam silos trincheira e 38% silos de superfície (BERNARDES, 2012).

Tanto as perdas quanto a qualidade das silagens armazenadas em silos horizontais são altamente dependentes do manejo, mais que nos outros tipos de silos (MUCK; SHINNERS, 2001). A grande relação superfície/volume faz com que os silos estejam mais susceptíveis a perdas, em virtude da respiração durante o enchimento, demandando rápido fechamento dos mesmos. Por ter uma maior área de contato entre a lona e a massa ensilada, o O<sub>2</sub> se dissemina em uma superfície maior.

As trocas gasosas são mais intensas quando o silo é mal vedado ou ocorre o rompimento da lona. Mesmo com boas condições de vedação, o uso de lonas plásticas de polietileno pode não impedir a penetração de O<sub>2</sub> nas áreas periféricas de silos horizontais durante o período de estocagem (BORREANI; TABACCO; CAVALLARIN, 2007). A permeabilidade das lonas plásticas pode ser ainda maior em regiões com temperaturas elevadas, como as tropicais e, no verão, em países de clima temperado (PAILLAT; GAILLARD, 2001). Um filme plástico de polietileno com espessura de 180 µm tem permeabilidade de 990 cm<sup>3</sup> m<sup>-2</sup> em 24 h a temperatura de 23°C, com o aquecimento do material para 50°C a permeabilidade ao O<sub>2</sub> aumenta para 3000 cm<sup>3</sup> m<sup>-2</sup> em 24 h (BORREANI; TABACCO, 2008). Bernardes, Nussio e Amaral (2011) relataram uma correlação positiva entre perdas de MS e permeabilidade ao O<sub>2</sub> das lonas plásticas.

A densidade dos silos horizontais tem relação com a penetração de ar na massa ensilada. Altas densidades são desejáveis porque reduzem a porosidade da massa, tendo efeito direto sobre as taxas de movimentação do O<sub>2</sub>, durante o enchimento do silo, a estocagem e a fase de utilização da silagem, reduzindo assim o desenvolvimento de microrganismos aeróbios e a deterioração. Outro ponto a ser considerado é que elevadas densidades reduzem custos por aumentar

a quantidade de material estocado e diminuir perdas (MUCK; HOLMES, 2000). Vários fatores relacionados com o manejo na ensilagem podem influenciar a densidade final da silagem. Existe uma alta correlação entre a densidade e a altura dos silos acima do centro de silos horizontais, demonstrando o efeito de auto compactação no silo, assim como ocorre nos silos torre. Entretanto, não são muito comuns silos horizontais excessivamente altos. Outros fatores que se correlacionam fortemente com a densidade são a espessura da camada inicial antes da compactação, peso do trator, tempo de compactação por tonelada depositada no silo, MS da cultura e tamanho médio de partícula (MUCK; HOLMES, 2000; RUPPEL et al., 1995). A densidade da silagem também pode variar de acordo com região do silo. O centro geralmente é mais denso pela auto compactação, enquanto as áreas periféricas e perto das paredes do silo a densidade é menor em função principalmente das dificuldades de compactação. Os valores de densidade, em silos do tipo trincheira, nas zonas periféricas são de 52-170 kg MS m<sup>-3</sup> e nas zonas centrais variam de 170-246 kg MS m<sup>-3</sup> (BORREANI; BERNARDES; TABACCO, 2008).

A parte superior do silo apresenta menor densidade, maior porosidade e, conseqüentemente, maior intensidade de trocas gasosas tornando esta área mais vulnerável à entrada de O<sub>2</sub> e conseqüentemente processo de deterioração aeróbia, decorrente do desenvolvimento de microrganismos aeróbios. Situação que é agravada pela alta superfície de contato com o ambiente, pela ineficiência dos filmes plásticos em barrar a entrada de O<sub>2</sub> e pela deficiência nas práticas de manejo na ensilagem. A deterioração nestas regiões pode se apresentar de forma visível pelo aparecimento de pontos de mofos e/ou camadas de silagem com coloração amarronzada. Entretanto, pode não haver características visíveis do processo de deterioração na camada superficial do silo, mesmo que esta apresente contagem microbiana alta. É ainda possível que as camadas inferiores

às áreas com visível aparecimento de mofos estejam também em processo de deterioração (MUCK; MOSER; PITT, 2003).

#### **2.2.4 Parâmetros que indicam deterioração aeróbia em silagens**

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). Com o avanço das pesquisas, muitas subsequentes metodologias foram desenvolvidas. Honig (1990) apresentou um método baseado no monitoramento do aumento da temperatura da silagem em recipientes isolados. Outra metodologia fundamentada na mensuração do CO<sub>2</sub> com titulação por KOH foi desenvolvida por Ashbell et al. (1991). Posteriormente, Moran et al. (1996) apresentaram um trabalho que comparava estas duas metodologias, mostrando que havia coerência entre o total de CO<sub>2</sub> produzido e o aumento de temperatura. Entretanto, segundo Borreani e Tabacco (2010), 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. A estabilidade aeróbia é, portanto, o número de horas que a silagem permanece estável antes de atingir 2°C acima da temperatura ambiente, quando exposta ao ar. Este método é muito eficiente para a determinação da estabilidade em ambientes controlados de laboratório, entretanto, nem sempre ele vai ser adequado em condições de campo.

O monitoramento da temperatura da silagem é um parâmetro adequado para medir a estabilidade. Isso porque os microrganismos deterioradores ao utilizarem os diferentes substratos produzem CO<sub>2</sub> e calor, ocorrendo aumento da temperatura da massa ensilada frente à temperatura ambiente. Outro parâmetro é a mensuração das alterações do pH, uma vez que um dos substratos utilizados

pelas leveduras e fungos filamentosos é o ácido láctico e com o consumo deste ocorre aumento dos valores de pH (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Segundo McEniry et al. (2007) outros índices para medir estabilidade aeróbia podem ser o pico (aumento máximo) da temperatura (°C), o intervalo em horas para se atingir este pico e o acumulado das diferenças de temperatura da silagem com o ambiente até 120 h de exposição.

Segundo Conaghan, O'Kiely e O'Mara (2010), em condições de laboratório, a deterioração aeróbia pode ser definida como a diferença acumulada de temperatura diária acima da temperatura ambiente nos primeiros cinco dias de exposição ao ar.

#### **2.2.5 Riscos envolvendo a deterioração aeróbia de silagens**

Pesquisas têm indicado que a deterioração aeróbia tem impacto negativo sobre o valor nutritivo da silagem. A adição de silagem deteriorada em dietas de novilhos foi associada com a diminuição do consumo de MS e digestibilidade da MO, FDN e PB (BOLSEN; WHITLOCK; URIARTE-ARCHUNDIA, 2002). O assunto deterioração aeróbia não se limita às questões relacionadas a perdas de MS e descarte de áreas deterioradas, o desenvolvimento de microrganismos pode influenciar nos aspectos ligados à sanidade da silagem (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002).

Tem sido demonstrado que as bactérias ácido butíricas, como as do gênero *Clostridium*, têm o crescimento favorecido pela penetração do O<sub>2</sub>, apesar de serem microrganismos estritamente anaeróbios. Com a penetração de O<sub>2</sub>, as leveduras iniciam a assimilação de ácido láctico, outros produtos da fermentação e CSA residual, com isso há um aumento da temperatura e pH (PAHLOW et al., 2003), com conseqüente consumo das substâncias inibidoras do crescimento destes microrganismos. As bactérias aeróbias também consomem o O<sub>2</sub>,

retomando a anaerobiose de parte do ambiente. Este novo ambiente anaeróbio e com reduzidas substâncias inibidoras favorece o crescimento de *Clostridium tyrobutyricum* e *C. sporogenes* (JONSSON, 1991). Vissers et al. (2007) observaram menor contaminação com bactérias ácido butíricas no centro dos silos horizontais quando comparado com as áreas periféricas do silo. Clostrídeos classificados como amilolíticos metabolizam açúcares em ácido butírico, enquanto os proteolíticos degradam proteína em amônia e aminas biogênicas, que reduzem a ingestão, ruminação, eructação e crescimento em ruminantes (PAHLOW et al., 2003).

Assim como os clostrídeos, os bacilos também são bactérias formadoras de endósporos, o que dificulta sua eliminação do leite até mesmo com pasteurização. Eles podem ser capazes de iniciar a deterioração, entretanto, estão mais ligados a estágios mais tardios de deterioração (PAHLOW et al., 2003). Seus inconvenientes estão ligados a perdas de MS, pela fermentação de carboidratos em ácidos orgânicos, etanol, 2,3-butanodiol e glicerol.

Outro microrganismo encontrado em silagens deterioradas é a *Listeria*. Verifica-se que ela é responsável por um grande número de enfermidades em animais, tais como, meningite, encefalites, septicemia e abortos, oferecendo riscos de contaminação também para seres humanos. A *L. monocytogenes* é anaeróbia facultativa, cresce em ambientes com valores de pH mais elevado (> 5) e com presença de oxigênio (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

A produção de micotoxinas pelos fungos causa vários efeitos indesejáveis à saúde de animais e humanos. As micotoxinas encontradas frequentemente nas silagens são: desoxinivalenol (DON), zearalenona, fumonisina e roquefortine C. A aflatoxina também pode ser encontrada em silagens confeccionadas em ambientes úmidos e quentes. A DON é produzida pelo gênero *Fusarium*, podendo causar recusa alimentar, diarreia, problemas reprodutivos, decréscimo da produção de vacas de leite e alteração da

fermentação ruminal e redução do fluxo de proteína do duodeno. A fumonisina, também produzida pelo gênero *Fusarium*, mostrou ser hepatóxica e nefrotóxica para bezerros, reduzem a ingestão de alimentos e a produção de leite por vacas leiteiras. Outra micotoxina produzida pelo *Fusarium* é a zearalenona, que pode provocar vários problemas reprodutivos e redução das taxas de concepção. A aflatoxina é produzida pelo gênero *Aspergillus*, os sintomas associados com sua ingestão ou inalação são inapetência, letargia, decréscimo da motilidade ruminal, redução da eficiência alimentar e da produção de leite e comprometimento da saúde animal. Ela tem alta toxicidade e é cancerígena para animais e humanos (QUEIROZ; RABAGLINO; ADESOGAN, 2011; CAVALLARIN et al., 2011).

Portanto, medidas que controlem a deterioração aeróbia de silagens têm como objetivo reduzir as perdas de MS e evitar a diminuição do valor nutritivo e da ingestão da silagem, pelos animais. Além disso, a preocupação crescente e a conscientização dos consumidores a respeito dos riscos alimentares, envolvendo os alimentos de origem animal, no futuro poderão forçar o mercado e os órgãos governamentais a impor limites mais rigorosos para a contaminação por micotoxinas, a respeito do que já ocorre em muitos países europeus.

### **2.3 Aditivos usados no controle de deterioração aeróbia em silagens**

O uso de aditivos em silagens tem por objetivo melhorar a processo de fermentação e preservar o valor nutritivo da cultura, assim reduzir a produção de ácido butírico e as perdas de MS. Os aditivos podem ser classificados de acordo com sua habilidade de influenciar a fermentação nas seguintes categorias: estimuladores da fermentação, inibidores da fermentação, inibidores da deterioração e nutritivos e absorventes (KUNG; STOKES; LIN, 2003). A cultura a ser ensilada é determinante na escolha do aditivo. Cada cultura tem suas

características fermentativas, necessitando de classes de aditivos distintos, ou até mesmo de mais de uma classe.

Os inoculantes bacterianos, classificados como estimuladores da fermentação, como as BAL heterofermentativas facultativas (comumente chamadas de homofermentativas), como *Lactobacillus plantarum*, vários *Pediococcus* e *Enterococcus faecium*, tem sido uma das categorias mais estudadas ao longo dos anos. Eles melhoram as características fermentativas, por produzirem 2 mols de ácido lático pela fermentação de 1 mol de glicose, processo pelo qual ocorrem perdas ínfimas de MS. Teoricamente, eles melhoram o processo fermentativo e aceleram a acidificação da silagem. Com isso vários microrganismos, responsáveis pelas fermentações secundárias, são inibidos reduzindo a proteólise, a quantidade do ácido acético e butírico e as perdas, proporcionando maior recuperação de energia. Estes inoculantes são muito interessantes em culturas que têm problemas fermentativos e alta capacidade tampão e umidade, como algumas leguminosas (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

Entretanto, o uso destes aditivos em silagens de milho pode agravar ainda mais o principal problema da cultura, que é a deterioração aeróbia após a abertura e nas áreas periféricas de silos horizontais. Kleinschmit, Schmidt e Kung (2005) estudaram o uso de *L. plantarum* como inoculante em silagem de milho. Observaram uma maior concentração de ácido lático, relação lactato/acetato e um maior teor de CSA, o que indica uma predominância da fermentação homolática. O uso deste inoculante, entretanto, levou ao decréscimo na estabilidade aeróbia o que foi reflexo de uma menor produção de substâncias inibidoras de fungos, como o ácido acético, e uma maior contagem de leveduras.

Portando, nos últimos anos vem sendo estudada uma ampla gama de aditivos químicos e biológicos, objetivando principalmente a inibição da deterioração aeróbia pelo controle do crescimento de microrganismos deterioradores.

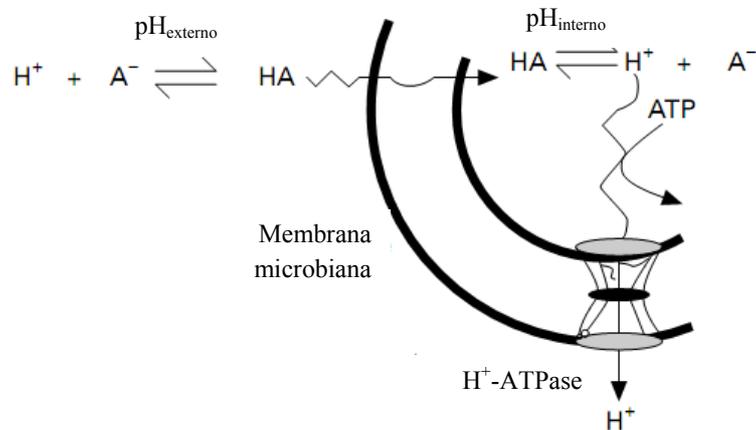
### 2.3.1 Aditivos biológicos

As propionato bacterias e as cepas de *Lactobacillus buchneri* são os dois inoculantes microbianos mais utilizados como aditivos inibidores de deterioração aeróbia. Dentre eles o *L. buchneri* vem ganhando destaque, em função dos bons resultados experimentais (KLEINSCHMIT; KUNG, 2006).

O *Lactobacillus buchneri* é uma BAL heterofermentativa obrigatória, que diferentemente das homofermentativas produzem outros compostos pela fermentação de glicose e frutose além do ácido láctico, como ácido acético, manitol e etanol. Justamente um destes componentes, o ácido acético, proporciona melhorias na estabilidade aeróbia das silagens, por suas características antifúngicas. Entretanto é um processo que leva à geração de perdas pela produção de CO<sub>2</sub>. O *L. buchneri* não possui a enzima acetaldeído desidrogenase, o que impede a redução do acetaldeído em etanol, aumenta a produção de ácido acético (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Outro produto gerado pela fermentação das hexoses pelo *L. buchneri* é o 1,2 propanodiol, o qual pode ser convertido a ácido propiônico pela *Lactobacillus diolivorans* (KROONEMAN et al., 2002).

O ácido acético apresenta ação no metabolismo de leveduras e fungos filamentosos. Isso porque o pH do meio é inferior ao seu pKa o que faz com que ele esteja na forma não dissociada. Nesta forma ele entra na célula microbiana por meio da sua membrana via transporte passivo. Uma vez dentro da célula o ácido é dissociado, em razão do pH interno ser próximo a 7,0 e ocorrer a liberação dos íons H<sup>+</sup> acidificando o meio intracelular (LAMBERT; STRATFORD, 1999). Para manter a neutralidade da célula, o microrganismo elimina os íons por transporte ativo, levando a um gasto de energia que prejudica seu crescimento e multiplicação, podendo levá-lo à morte (Figura 1).

O uso do *L. buchneri* na concentração de  $1 \times 10^6$  ufc  $g^{-1}$  de forragem em silagens de milho promoveu maior concentração de ácido acético e menor contagem de leveduras, o que refletiu em uma maior estabilidade aeróbia (>900 h) em relação aos demais tratamentos (RANJIT; KUNG, 2000). A contagem de leveduras no tratamento com *L. buchneri* ( $1 \times 10^6$  ufc  $g^{-1}$ ) aumentou de  $10^2$  na abertura para  $10^6$ , após 6 dias, enquanto os demais tratamentos aumentaram em média de  $10^6$  para  $>10^8$ .



**Figura 1** Mecanismo de ação de ácidos fracos na forma não dissociada na célula microbiana.

Adaptado de: Lambert e Stratford, 1999.

Tabacco et al. (2011), ao estudarem o efeito de duas cepas de *L. buchneri* em silagens de milho provenientes de fazendas comerciais, observaram nas silagens tratadas menor concentração de ácido lático, menor relação lactato/acetato, menor contagem de leveduras e alta estabilidade aeróbia, quando comparadas às não tratadas (107 e 121 h nas silagens tratadas e 64 e 74 h nas não tratadas, para os experimentos 1 e 2, respectivamente). Resultados semelhantes foram observados por Mari et al. (2009) ao avaliarem silagens inoculadas ou não com *L. buchneri*, onde o número de leveduras foi menor (4,75

log ufc g<sup>-1</sup>) e a estabilidade maior (74 h) nas silagens inoculadas em relação às não inoculadas (5,55 log ufc g<sup>-1</sup> e 46 h).

Uma nova linha de pesquisa, principalmente na América do Sul e Ásia, tem trabalhado com desenvolvimento de inoculantes bacterianos específicos para determinadas culturas e geralmente isolados da própria cultura. Isso porque a maior parte das empresas que produz inoculantes está localizada em países de clima temperado, onde desenvolve e faz seus testes com gramíneas e leguminosas de clima temperado. Portanto, a eficiência destes inoculantes pode não ser a mesma em gramíneas e leguminosas de clima tropical (MUCK, 2012). Ávila et al. (2009) identificaram uma cepa da *L. buchneri* que foi melhor que as cepas comerciais em reduzir a concentração de etanol e a contagem de leveduras enquanto aumentou a estabilidade aeróbia de silagens de cana de açúcar.

### **2.3.2 Aditivos químicos**

Os ácidos benzoico e sórbico na forma dos sais benzoato de sódio e sorbato de potássio são comumente utilizados na indústria de alimentos para prevenir o crescimento de leveduras e fungos filamentosos (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Recentemente, tem-se intensificado os estudos destes como aditivos controladores de deterioração aeróbia em silagens. Assim como o ácido acético, o benzoato de sódio está na forma não dissociada, passando facilmente pela membrana celular dos fungos, liberando prótons que acidificam o meio intracelular (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

Em muitos trabalhos tem sido comprovada a ação do ácido sórbico e do sorbato de potássio na redução do crescimento de leveduras e fungos filamentosos, melhorando a estabilidade aeróbia das silagens (ALLI et al., 1985; WYSS; BOLLER; WIEMKEN, 1991). O uso de benzoato de sódio também vem apresentando resultados positivos. O uso de 0,08% de benzoato de sódio

melhorou a estabilidade aeróbia de silagem de gramíneas (LINGVALL; LATTEMAE, 1999). Kleinschmit, Schmidt e Kung (2005), estudando o efeito de vários aditivos antifúngicos em silagem de milho, observaram que as silagens tratadas com benzoato de sódio (0,1%) apresentaram alta concentração de carboidratos solúveis, menores perdas e menor concentração de etanol. Os aditivos benzoato de sódio, sorbato de potássio mais EDTA e *L. buchneri* ( $4 \times 10^5$  ufc g<sup>-1</sup>) mantiveram a estabilidade aeróbia da silagem por maior tempo, chegando a 165 h para o benzoato de sódio. Dos aditivos estudados por Pedroso et al. (2008) o benzoato de sódio e *L. buchneri* foram os que melhoraram a estabilidade aeróbia nas silagens.

## REFERÊNCIAS

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, 2003. Cap. 12, p. 547-608. (Agronomy, 42).

ALLI, I. et al. The effects of sorbates on the ensilage of chopped whole-plant maize and lucerne. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 36, n. 2, p. 63-70, fev. 1985.

ANUALPEC 2011: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Informa Economics FNP, 2012.

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

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.

ÁVILA, C. L. S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 384-394, dec. 2009.

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, 2012. p. 249-268.

BERNARDES, T. F. **Levantamento das práticas de produção e uso de silagens em fazendas produtoras de leite no Brasil**. Lavras: Milkpoint: UFLA, 2012. Disponível em: <<http://www.Milkpoint.com.br/pdf/EBOOK-SILAGEM.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

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

BERNARDES, T. F.; NUSSIO, L. G.; AMARAL, R. C. Top spoilage losses in maize silage sealed with plastic films with different permeabilities to oxygen. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 67, n. 1, p. 34-42, mar. 2012.

BOLSEN, K. K.; WHITLOCK, L. A.; URIARTE-ARCHUNDIA, M. E. Effect of surface spoilage on the nutritive value of maize silage diets. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive, Scotland: [Cornell University], 2012. p. 76-77.

BORREANI, G.; BERNARDES, T. F.; TABACCO, E. Aerobic deterioration influences the fermentative, microbiological and nutritional quality of maize and sorghum silages on farm in high quality milk and cheese production chains. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, p. 68-77, jul. 2008. Número especial.

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, 2012. p. 71-72.

BORREANI, G.; TABACCO, E. Low permeability to oxygen of a new barrier film prevents butyric acid bacteria spore formation in farm corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 11, p. 4272-4281, nov. 2008.

BORREANI, G.; TABACCO, E. Temperature measurements of large scale silo face to assess aerobic deterioration of corn silage on farm. In:

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 1., 2009, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro: FEALQ, 2009. p. 175-188.

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, jun. 2010.

CARVALHO, I. Q.; BUENO, E. S.; ABRAÃO, C. **Relatório dos resultados do 2º Concurso de Silagem da Fundação ABC**. Castro, PR: Fundação ABC Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário, 2010.

CAVALLARIN, L. et al. Aflatoxin accumulation in whole crop maize silage as a result of aerobic exposure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, West Sussex, v. 91, n. 13, p. 2419 -2425, jun. 2011.

CONAGHAN, P.; O'KIELY, P.; O'MARA, F. P. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 2, p. 628-643, feb. 2010.

DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTEVILLE, T. J. (Ed.). **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington, DC: ASM Press, 1997. p. 520-556.

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

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

HONIG, H. Reducing losses during storage and unloading of silage. In: PAHLOW, G.; HONIG, H. (Ed.). **Forage conservation towards 2000**. Braunschweig: European Grassland Federation, p. 116-128, 1991.

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. 4, p. 557-568, 1991.

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

KLEINSCHMIT, D. H.; SCHMIDT, R. J.; KUNG, L. JUNIOR. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 6, p. 2130-2139, jun. 2005.

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

KUNG, L. JUNIOR.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H (Co-ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA, 2003. Cap. 7, p. 305-360. (Agronomy, 42).

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.

LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICHS, E. J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 5, p. 922-928, may 1996.

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], 2002. p. 503-511.

LINGVALL, P.; LATTEMAE, P. Influence of hexamine and sodium nitrite in combination with sodium benzoate and sodium propionate on fermentation and hygienic quality of wilted long cut grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 2, p. 257-264, feb. 1999.

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

McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. Microorganisms. In: McDONALD, P. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Aberystwyth, UK: Chalcombe Publications, 1991. p. 81-152.

McENIRY, J. et al. The relative impacts of wilting, chopping, compaction and air infiltration on the conservation characteristics of ensiled grass. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 470-484, dec. 2007.

McGECHAN, M. B.; WILLIAMS, A. G. A model of air infiltration losses during silage storage. **Journal of Agricultural Engineering Research**, London, v. 57, n. 4, p. 237-249, apr. 1994.

McISAAC, J. A.; LOVERING, J. A model for estimating silo losses and costs. **Canadian farm economics**, Ottawa, v. 15, p. 10-16, 1980.

MORAN, J. P. et al. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11., 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth: [IGER], 1996. p. 162-163.

MUCK, R. E.; MOSER, M. R.; PITT, R. E. Postharvest factors affecting ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Co-ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA, 2003. Cap. 6, p. 251-304. (Agronomy, 42).

MUCK, R. E.; HOLMES, B. J. Factors affecting bunker silo densities. **Applied Engineering in Agriculture**, St. Joseph, v. 16, n. 6, p. 613-619, nov. 2000.

MUCK, R. E. Microbiology of ensiling. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012, Hameenlinna. **Proceedings...** Hameenlinna, Finland: MTT Agrifood Research Finland University of Helsinki, 2012. p. 75-86.

MUCK, R. E.; SHINNERS, K. J. Conserved forage (silage and hay): progress and priorities. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: Brazilian Society of Animal Husbandry, 2001. p. 753-762.

PAILLAT, J. M.; GAILLARD, F. Air-tightness of wrapped bales and resistance of polythene stretch film under tropical and temperate conditions. **Journal of Agricultural Engineering Research**, London, v. 79, n. 1, p. 15-22, 2001.

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, 2003. Cap. 2, p. 31-93. (Agronomy, 42).

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

PEDROSO, A. F. et al. Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 6, p. 589-594, nov./dec. 2008.

QUEIROZ, O. C. M. et al. Effect of a dual-purpose inoculant on the quality and nutrient losses from corn silage produced in farm-scale silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 6, p. 3354-3362, jun. 2012.

QUEIROZ, O. C. M.; RABAGLINO, M. B.; ADESOGAN, A. T. Mycotoxins in silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2011. p. 105-126.

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, jan. 1995.

SAVOIE, P.; JOFRIET, J. C. Silage storage. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Co-ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA, 2003. Cap. 9, p. 405-469. (Agronomy, 42).

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.

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.

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, feb. 2007.

WEINBERG, Z. G. et al. Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silages. **Grassland Science**, Tochig, v. 57, n. 1, p. 46-50, mar. 2011.

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, apr. 2001.

WILKINSON, J. M.; BOLSEN, K. K.; LIN, C. J. History of silage. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Co-ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA, 2003. Cap. 1, p. 1-30. (Agronomy, 42).

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

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. 4. ed. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 350.

WYSS, P. T.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Phytoalexin in response is elicited by a pathogen (*Rhizoctoniasolani*) but not by a mycorrhizal fungus (*Glomusmosseae*) in bean roots. **Experientia**, Basel, v. 47, p. 395-399, 1991.

## **SEGUNDA PARTE**

**ARTIGO: Aditivos como controladores da deterioração aeróbia em silagem de milho na região periférica de silo trincheira**

## RESUMO

Em regiões de clima tropical o processo de deterioração aeróbia é mais intenso, podendo ocorrer de forma grave em áreas periféricas dos silos horizontais. Portanto, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito de duas cepas de *Lactobacillus buchneri* (comercial e indígena) e do benzoato de sódio no controle da estabilidade aeróbia em silagens de milho. Foram conduzidos dois experimentos onde foram testados os seguintes tratamentos: controle (C); *L. buchneri* cepa comercial CNCM I-4323 (LBC) e *L. buchneri* (NCBI HM162412.1) cepa indígena proveniente do Laboratório de Microbiologia da UFPA (LBI), na concentração de  $1 \times 10^6$  ufc g<sup>-1</sup> de forragem fresca; benzoato de sódio (SB) na concentração de 0,2% da forragem fresca. O experimento 1 foi realizado em silos experimentais em um delineamento inteiramente casualizado e o experimento 2 em silo de trincheira com aplicação dos tratamentos no topo em um delineamento em blocos casualizados. Ambos foram analisados usando o recurso MIXED GLM do programa SAS. O LBI apresentou menor concentração de ácido láctico ( $P < 0,05$ ) que SB, maior concentração de ácido acético ( $P < 0,05$ ) que o C, o que resultou em um pH mais elevado ( $P < 0,05$ ) que as demais silagens (experimento 1). Foi observada tendência ( $P = 0,069$ ) de diminuição da contagem de leveduras no experimento 1 quando o SB foi aplicado. Em ambos os experimentos o SB proporcionou aumento na estabilidade aeróbia ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos. As silagens tratadas com SB apresentaram maior recuperação de carboidratos solúveis em água (CSA) ( $P < 0,05$ ) e menores perdas de MS (PMS) ( $P < 0,05$ ) que C, LBC e LBI, sendo que no experimento 2 as perdas foram semelhantes aos do centro do silo trincheira. O SB foi o mais eficiente em conservar os nutrientes e em manter a estabilidade aeróbia da silagem.

Palavras-chave: Benzoato de sódio. Estabilidade aeróbia. *Lactobacillus buchneri*.

## ABSTRACT

In warm climates, the aerobic stability of silage is a very important factor in determining its quality. Thus, the objective of this study was to evaluate two *Lactobacillus buchneri* strains (a commercial product and an indigenous specie) and sodium benzoate in improving aerobic stability of corn silage in laboratorial (experiment 1) and field conditions (experiment 2). For both experiments a corn hybrid was grown at University of Lavras (21° 14' S; 45° 00' W) and harvested at 50% milk line stage (36.8% DM). Chopped forage was treated with 1) deionized water (CON); 2) a commercial *L. buchneri* (CLB; strain CNCM I-4323); 3) an indigenous *L. buchneri* (ILB; NCBI HM162412.1), which was isolated from tropical forages; or 4) sodium benzoate at 0.2% (SB). Both inocula were applied at a rate of  $1 \times 10^6$  cfu of bacteria  $g^{-1}$  of forage. In experiment 1, five replicates of each treatment were ensiled in 15-L plastic jars for 103 d. Chemical composition, microbial counts and aerobic stability were assessed. In experiment 2, the upper layer of the bunker silo was divided into four blocks where the treatments were applied. Plastic net bags with fresh forage were buried in the upper layer and in the center of the bunker. After 116 d of conservation, the bags were weighed to determine DM losses and the silages were analyzed for the chemical and microbial characteristics. In experiment 1, silages inoculated with ILB had greater pH value (4.05) than other treatments ( $P < 0.05$ ). Acetate was higher in ILB silages (0.85% DM,  $P < 0.05$ ) compared with CON silages (0.36% DM), and CLB and SB silages showed intermediate concentrations (0.67 and 0.48%, respectively). SB silages showed higher lactic acid concentration (5.86% DM,  $P < 0.05$ ) than ILB silages (2.17% DM), and CON and CLB silages had intermediate values. The number of yeasts and molds was similar among treatments. However, SB tended to affect yeasts number ( $P = 0.069$ ). In experiment 2, SB silages had more residual water-soluble carbohydrates than other silages ( $P < 0.05$ ) and lower concentration of acetic, propionic and butyric acids. SB was also effective in reducing DM losses during storage among treatments. SB silages differed in aerobic stability and aerobic deterioration than other silages. SB was the most effective additive, producing well-fermented silage and a long aerobic stability.

Keywords: Aerobic stability. *Lactobacillus buchneri*. Sodium benzoate.

## 1 INTRODUÇÃO

A silagem de milho é a principal fonte de forragem e energia para rebanhos leiteiros no Brasil e em diversas partes do mundo (BERNARDES, 2012; WILKINSON; TOIVONEN, 2003). Essa espécie forrageira apresenta concentração de MS adequada, teores de carboidratos solúveis em água (CSA) elevados e baixo poder tamponante no momento ideal de corte, o que favorece a fermentação da massa (BUXTON; O'KIELY, 2003). A alta eficiência fermentativa do milho proporciona uma silagem com alto teor de ácido lático e carboidratos solúveis em água (CSA) residuais, o que é desejado, pois uma rápida acidificação do meio, juntamente com a anaerobiose, é necessária para a conservação da massa ensilada. Entretanto, ao entrar em contato com o oxigênio, os microrganismos aeróbios, presentes na silagem, iniciam suas atividades metabólicas, consumindo os produtos da fermentação, o que gera calor e aumento do pH, resultando na deterioração aeróbia (WOOLFORD, 1984).

Muitas das silagens estocadas em silos horizontais estão expostas à penetração do ar, especialmente nas regiões periféricas, em razão da menor densidade, maior porosidade e intensidade de trocas gasosas. Em virtude das diferenças de compactação, as perdas no topo são tipicamente maiores próximas as paredes quando comparadas ao centro do silo trincheira (76% vs 16%; ASHBELL; KASHANCI, 1987) e na camada superficial (25 cm iniciais) em relação às camadas inferiores (60% vs 22%; McLAUGHLIN; WILSON; BOWDEN, 1978). As lonas plásticas não são totalmente impermeáveis ao oxigênio, permitindo seu ingresso na massa (BORREANI; TABACCO; CAVALLARIN, 2007), o que também contribui para tornar o topo do silo mais propenso à deterioração aeróbia.

Dos fatores que influenciam na deterioração aeróbia, como concentração de MS da cultura, tamanho de partícula, compactação, temperatura, selamento e

taxa de retirada do painel (PITT, 1990), apenas a temperatura ambiente não é passível de controle. Altas temperaturas, durante a estocagem e na etapa de desabastecimento do silo, comumente encontradas em ambiente de clima quente (tropical/subtropical), podem aumentar a taxa de crescimento dos microrganismos deterioradores (ASHSELL et al., 2002; McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Ashbell et al. (2002) estudaram silagens de milho e trigo expostas ao ar por 3 ou 6 dias a 10, 20, 30 ou 40°C e, encontraram maior intensidade de deterioração a 30°C, em função do maior crescimento de leveduras e fungos filamentosos a esta temperatura.

A deterioração aeróbia é indesejada, principalmente, porque está associada com altas perdas de nutrientes e MS, diminuição da ingestão e relação com problemas de saúde animal (BOLSEN; WHITLOCK; URIARTE-ARCHUNDIA, 2002; McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; QUEIROZ; RABAGLINO; ADESOGAN, 2011). Por isso, o uso da classe de aditivos controladores da deterioração aeróbia vem crescendo (MUCK, 2012). Os aditivos baseados em bactérias heterofermentativas obrigatórias, particularmente a espécie *L. buchneri*, tem como meta o aumento da produção de ácido acético, um importante antifúngico (MARI et al., 2009; TABACCO et al., 2011; RANJIT; KUNG, 2000). Kleinschmit e Kung (2006), resumindo os resultados de 26 experimentos com uso de *L. buchneri* em silagem de milho, observaram aumento na concentração de ácido acético, decréscimo no número de leveduras e aumento da estabilidade aeróbia das silagens tratadas. Boa parte desses estudos foram conduzidos em ambientes de clima temperado, onde as principais empresas produtoras de inoculantes se encontram, contudo, os mesmos podem ou não ser efetivos quando usados em ambientes de clima quente (MUCK, 2012). Desse modo, torna-se importante isolar microrganismos naturais de uma determinada cultura e região, a fim de encontrar novas cepas

mais adaptadas e capazes de potencializar o uso do aditivo (ÁVILA et al. 2009; MUCK, 2012).

Uma alternativa aos aditivos biológicos tem sido o uso de ácidos orgânicos tamponados (CONAGHAN; O'KIELY; O'MARA, 2010). O benzoato de sódio tem apresentado efeitos positivos na redução do crescimento de leveduras e fungos filamentosos, melhorando, assim, a estabilidade aeróbia da silagem (KLEINSCHMIT; SCHMIDT; KUNG, 2005; LINGVALL; LATTEMAE, 1999). Entretanto, poucos trabalhos utilizaram exclusivamente o benzoato de sódio, a maioria dos estudos avaliou a associação de vários aditivos químicos. Os aditivos químicos podem ter efeito mais robusto que os aditivos biológicos, cuja eficácia é dependente de diversos fatores como a umidade do substrato, competição com a população microbiana epífita nativa e condições de armazenamento do produto comercial (CONAGHAN; O'KIELY; O'MARA, 2010; KUNG; STOKES; LIN, 2003).

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar estratégias de manejo na ensilagem, com base na avaliação de dois aditivos biológicos (*Lactobacillus buchneri*, cepa CNCM I-4323 e *Lactobacillus buchneri* (NCBI HM162412.1), cepa indígena proveniente do Laboratório de Microbiologia da UFLA e um aditivo químico (Benzoato de sódio), aplicados no topo da massa, visando ao controle da deterioração aeróbia em áreas periféricas de silo trincheira. Foi avaliado, para isso, o perfil fermentativo, químico, microbiano e a estabilidade aeróbia da silagem de milho armazenada em laboratório e em condições de campo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### Colheita

Os experimentos (1 e 2) foram realizados nas dependências do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (latitude de 21° 14' 43" sul e longitude de 44° 59' 59" oeste; altitude de 918 m). O híbrido de milho utilizado em ambos os experimentos foi o AG 5011 (Sementes Agrocere, Brasil). As plantas foram colhidas, quando apresentavam grãos com metade da linha do leite, em fevereiro de 2012, utilizando-se colhedora de uma linha (JF Máquinas Agrícolas, SP, Brasil) acoplada ao trator. Amostras foram recolhidas aleatoriamente para a determinação do tamanho médio de partículas (TMP) (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINRINCHS, 1996).

### Experimento 1

A forragem picada foi dividida em quatro montes, os quais foram utilizados para a confecção dos seguintes tratamentos: controle (C); *Lactobacillus buchneri* (cepa CNCM I-4323) na concentração de  $1 \times 10^6$  ufc  $g^{-1}$  de forragem na mateira natural (LBC); *Lactobacillus buchneri* (NCBI HM162412.1, cepa indígena proveniente do Laboratório de Microbiologia da UFLA) na concentração de  $1 \times 10^6$  ufc  $g^{-1}$  de forragem na matéria natural (LBI); benzoato de sódio com concentração de 0,2% da forragem na matéria natural (SB). O benzoato de sódio (Vetec Química Fina, Brasil) possuía teor mínimo de pureza de 99,5%. Os aditivos foram diluídos em água destilada, sendo aplicados 12 mL de solução por kg de forragem por meio de um pulverizador manual. O controle também recebeu a mesma quantidade de água dos tratamentos com aditivos.

Como silos experimentais foram utilizados baldes plásticos com capacidade de 15 L. Cada tratamento foi composto por 5 repetições. A compactação foi realizada manualmente, atingindo-se densidade média de  $443 \pm 13 \text{ kg m}^{-3}$  de matéria natural. Após a compactação, cada silo foi vedado com tampa plástica apropriada e, posteriormente, pesado. Aos 103 dias de fermentação, os mesmos foram novamente pesados para determinação das perdas de MS (PMS), de acordo com a equação proposta por Bolsen (1997)  $RMS = ((MFi \times MSf) / (MFi \times MSi)) \times 100$ , em que RMS = recuperação de matéria seca (%); MFi = massa de forragem inicial (kg); MSi = concentração de MS inicial (%); MFf = massa de forragem final (kg); MSf = concentração de MS final (%).

Após a abertura dos silos, aproximadamente 5 cm de silagem, proveniente do topo de cada unidade experimental, foi descartada e a quantidade restante foi homogeneizada e subamostrada. Cada subamostra foi submetida à determinação da composição química, perfil fermentativo e contagem microbiana. As silagens também foram submetidas a um teste de estabilidade aeróbia. Aproximadamente 3 kg de silagem foram colocados em baldes plásticos, os quais foram cobertos com folha de papel alumínio para se evitar perda de umidade da silagem e contaminação por elementos externos (TABACCO et al., 2009). Os baldes foram mantidos em uma sala fechada a  $20,4 \pm 0,9^\circ\text{C}$  por 12 dias. A temperatura da sala e das silagens foi registrada, a cada hora, por meio de *data loggers* (HT-500, Instruterm, SP, Brasil e Pro2.07.09, Escort Console, SP, Brasil). A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas que a silagem permaneceu estável antes de atingir  $2^\circ\text{C}$  acima da temperatura ambiente (MORAN et al., 1996). A deterioração aeróbia foi definida como a diferença acumulada de temperatura diária acima da temperatura ambiente nos primeiros cinco dias (CONAGHAN; O'KIELY; O'MARA, 2010). Em outro conjunto de baldes, foram depositados cerca de 3 kg

de silagem para a determinação do perfil do pH ao longo da exposição aeróbia, os quais também foram cobertos com uma folha de alumínio e amostrados nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 de aerobiose.

O material pré-ensilado e as silagens, ambos em duplicata, foram levados à estufa de ventilação forçada a 55°C por 72h para determinação da MS (AOAC, 1990) e, posteriormente moídos em peneira de crivo de 1 mm para posterior determinação da proteína bruta (PB), conforme a AOAC (1990), quantificação da fibra em detergente neutro (FDN) conforme Van Soest, Robertson e Lewis (1991) e CSA (DISCHE, 1962). A determinação do pH, nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), ácidos orgânicos e etanol foram obtidos por meio de um extrato aquoso (1:10) com água destilada. O pH foi medido com potenciômetro (HI 2221, Hanna Instruments) e o nitrogênio amoniacal segundo técnica descrita por Noel e Hambleton (1976). Para a determinação dos ácidos orgânicos e do etanol foi utilizado cromatógrafo de fase líquida (Shimadzu LC-10Ai; Shimadzu Corp., Tokyo, Japão). Os ácidos foram detectados pela absorvância do UV (210nm) e índice de refração, e o etanol foi identificado usando o detector de índice de refração (CARVALHO et al., 2012). Outra amostra foi utilizada para a contagem de leveduras, fungos filamentosos e BAL, utilizando um extrato aquoso (1:10) com água peptonada (1g por litro de água), homogeneizado durante 4 minutos no Stomacher (Stomacher 400, Seward, London, UK). Para a contagem de leveduras e fungos filamentosos foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície com o meio de cultura YGC Agar (Fluka, Sigma Aldrich Química Brasil LTDA), sendo preparadas diluições em série (10<sup>-2</sup> a 10<sup>-6</sup>) e em duplicata (TABACCO et al., 2009). Após incubação a 28 °C durante três e cinco dias para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente, foram contadas as colônias separadamente, com base nas suas características macromorfológicas. Para a contagem de BAL foi usada a mesma técnica descrita para leveduras e fungos filamentosos, entretanto o meio de

cultura utilizado foi o MRS Agar (Himedia, Biosystems Comercial de Importação e Exportação e Equipamentos para Laboratório), e a incubação foi realizada a 35°C por três dias, quando se procedeu à contagem.

## **Experimento 2**

Foi utilizado um silo tipo trincheira no experimento 2. Antes de ser abastecido, o mesmo foi revestido com filme plástico nas laterais, com sobras de 2 m, as quais foram usadas no envelopamento do topo. Após ser abastecido, o silo foi dividido em 4 faixas transversais de 8 m cada, as quais constituíram os blocos. As extremidades, cerca de 4 m cada, foram desprezadas. Cada bloco foi novamente dividido em 4 faixas de 2 m cada, onde foram alocados os tratamentos aleatoriamente. Os aditivos e as concentrações foram as mesmas do Experimento 1, sendo diluídos em água (não clorada) e, por meio de regadores, aplicados no topo das respectivas unidades experimentais. Para garantir percolação média de 20 cm foram aplicados 13 L de água por m<sup>2</sup>. A relação entre percolação e quantidade de água aplicada havia sido determinada em ensaios anteriores. No tratamento controle foi aplicada água na mesma quantidade dos demais tratamentos.

Em cada unidade experimental foram distribuídos três sacos de nylon (dois no topo e um no centro da massa), contendo cerca de 6 kg de forragem. Os sacos localizados no centro receberam forragem sem tratamento. Os sacos da superfície receberam forragem tratada. Estes sacos foram depositados no topo do silo, após leve retirada de forragem e cobertos com uma camada fina de forragem, mantendo-se uma distância de 1,5 m da parede do silo. Antes de serem reposicionados nas faixas correspondentes a cada tratamento, os mesmos foram pesados e amostrados para a determinação futura das PMS e das demais variáveis. Foram acondicionados em todos os sacos *data loggers* programados

para a tomada de temperatura da massa em intervalos constantes de 6 horas, com o objetivo de determinar o perfil de temperatura na estocagem.

Terminado o abastecimento e a distribuição dos tratamentos, o silo foi vedado com um filme plástico dupla face e uma rede (tipo sombrite) foi colocada sobre a lona, onde permaneceu fechado por um período de 116 dias. Após a abertura, os sacos foram removidos de acordo com o seu posicionamento na trincheira. Semanalmente foi medido o avanço do painel para posterior determinação do avanço médio diário. A densidade foi medida 9 vezes no topo (20 cm) e no centro do silo trincheira (MUCK; HOLMES, 2000). A temperatura média diária, durante o período de utilização do silo, referentes aos meses de julho, agosto, setembro e outubro foram 16,8; 18,0; 20,4 e 22,9°C.

Após a retirada de cada saco o mesmo foi pesado para a determinação da PMS. Todo o seu conteúdo foi homogeneizado e fracionado em três porções. A primeira foi utilizada na determinação da concentração de MS e das análises químicas, a segunda serviu para a realização da contagem de leveduras, fungos filamentosos e BAL, leitura do pH, mensuração do nitrogênio amoniacal, ácidos orgânicos e etanol. A terceira foi usada para a determinação da estabilidade aeróbia da silagem. Todos estes procedimentos foram estabelecidos conforme descrito no Experimento 1.

### **Delineamento Experimental e Análises Estatísticas**

Houve transformação para  $\log_{10}$  das contagens microbiológicas, visando obter distribuição normal dos dados. No Experimento 1, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições e 4 tratamentos. No Experimento 2, o delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 4 blocos e 4 tratamentos. Em ambos os experimentos as variáveis foram submetidas à análise de variância utilizando-se o recurso

PROC MIXED do programa SAS (2000) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e foi considerado tendência até 10%. Para a variável PMS no Experimento 2 foi utilizado um modelo onde se comparavam as perdas do centro com as da superfície, considerando o centro como um tratamento.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### RESULTADOS

Na Tabela 1 estão representadas as características do silo trincheira utilizados no experimento 2.

**Tabela 1** Características do silo trincheira utilizado no experimento 2.

<b>Itens</b>	
Comprimento (m)	40
Largura superior (m)	6,7
Largura da base (m)	4,7
Altura (m)	1,2
Avanço médio diário (cm)	31
Densidade no centro (kg m <sup>-3</sup> )	561 ± 44
Densidade no topo (kg m <sup>-3</sup> )	535 ± 55

As características químicas e distribuição de partículas da forragem antes da ensilagem estão descritas na Tabela 2. O milho cortado com metade da linha do leite usado para ensilagem em ambos os experimentos apresentou concentração de MS, PB, FDN e CSA dentro dos padrões esperados.

**Tabela 2** Características químicas e distribuição de partículas da forragem de milho antes da ensilagem para ambos os experimentos.

<b>Itens</b>	
MS (%)	36,8 ± 0,18
PB (% da MS)	6,53 ± 0,22
FDN (% da MS)	55,2 ± 3,12
CSA (% da MS)	5,79 ± 1,56
Distribuição do tamanho das partículas (%)	
>19,1 mm	12 ± 4,28
7,9 a 19,1 mm	58 ± 4,93
0,18 a 7,9 mm	28 ± 4,91
<0,18 mm	2 ± 0,93

CSA, carboidratos solúveis em água; FDN, fibra em detergente neutro; MS, matéria seca; PB, proteína bruta; TMP, tamanho médio de partícula.

## Experimento 1

A composição química, os produtos finais da fermentação, população microbiana e a estabilidade aeróbia das silagens estão apresentadas na Tabela 3. O conteúdo de MS das silagens submetidas aos diferentes tratamentos foi similar ( $P > 0,05$ ) com valores variando de 33,9 a 34,8%. As silagens tratadas com LBI apresentaram estatisticamente maior pH em relação aos demais tratamentos. Os tratamentos influenciaram estatisticamente as concentrações de etanol, ácido láctico e acético. O SB promoveu menores concentrações de etanol em relação ao C e LBC e maior concentração de ácido láctico quando comparado ao LBI. O conteúdo de ácido acético da silagem tratada com LBI foi superior frente às silagens não tratadas. A quantidade de ácido propiônico e butírico foi estatisticamente similar entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ), com médias de 0,7 % e abaixo do nível de detecção, respectivamente. Os inoculantes bacterianos promoveram maior contagem de BAL ( $P < 0,05$ ). Os tratamentos não tiveram efeito na contagem de fungos filamentosos, havendo tendência de diminuição na contagem de leveduras quando o SB foi aplicado ( $P = 0,069$ ) e, numericamente, ocorreu o mesmo comportamento com a população de fungos filamentosos.

As PMS foram influenciadas pelos tratamentos, sendo menores na silagem tratada com SB que no LBI e intermediárias no C e LBC. Os teores de FDN foram similares para os tratamentos, enquanto PB foi maior no LBI e para os outros não houve diferença. A recuperação de CSA foi maior no SB em relação aos demais tratamentos. O conteúdo de N-NH<sub>3</sub> foi estatisticamente menor no SB e maior no C e LBC.

O SB apresentou estabilidade aeróbia significativamente superior ao C, LBC e LBI. A deterioração aeróbia obedeceu a este mesmo comportamento. O SB foi o que apresentou menor acúmulo de diferença de temperatura, seguido

pelo LBI e C. As silagens tratadas com LBC mostraram valores intermediários entre o outro inoculante bacteriano e a silagem controle.

**Tabela 3** Qualidade fermentativa, composição microbiológica e química, estabilidade aeróbia e perdas das silagens controle (C), tratadas com *L. buchneri* comercial (LBC), *L. buchneri* indigena (LBI) ou benzoato de sódio (SB) após 103 dias de fermentação (Experimento 1).

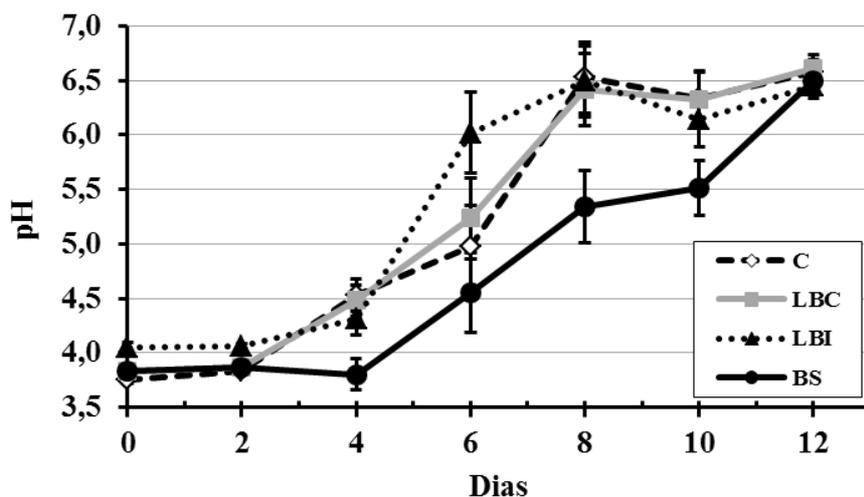
Variáveis	Tratamentos				EPM	P valor
	C	LBC	LBI	SB		
MS (%)	34,8	34,7	33,9	34,6	0,414	0,449
FDN (% da MS)	48,1	47,8	46,5	50,1	1,877	0,602
PB (% da MS)	6,57 <sup>b</sup>	6,80 <sup>b</sup>	7,27 <sup>a</sup>	6,71 <sup>b</sup>	0,098	<0,001
N-NH <sub>3</sub> (% do N total)	10,5 <sup>a</sup>	10,9 <sup>a</sup>	10,1 <sup>ab</sup>	8,41 <sup>b</sup>	0,443	0,006
CSA (% da MS)	0,80 <sup>b</sup>	0,87 <sup>b</sup>	0,57 <sup>b</sup>	1,66 <sup>a</sup>	0,119	<0,001
pH	3,76 <sup>b</sup>	3,83 <sup>b</sup>	4,05 <sup>a</sup>	3,83 <sup>b</sup>	0,040	<0,001
Ácido lático (% da MS)	5,39 <sup>ab</sup>	5,47 <sup>ab</sup>	2,17 <sup>b</sup>	5,86 <sup>a</sup>	0,854	0,026
Ácido acético (% da MS)	0,36 <sup>b</sup>	0,67 <sup>ab</sup>	0,85 <sup>a</sup>	0,48 <sup>ab</sup>	0,106	0,024
Ácido propiônico (% da MS)	0,07	0,07	0,13	0,07	0,029	0,298
Ácido butírico (% da MS)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	- <sup>1</sup>	-
Etanol (% da MS)	1,36 <sup>a</sup>	1,54 <sup>a</sup>	1,14 <sup>ab</sup>	0,74 <sup>b</sup>	0,113	<0,001
BAL (log <sub>10</sub> ufc g <sup>-1</sup> )	5,45 <sup>b</sup>	7,48 <sup>a</sup>	7,75 <sup>a</sup>	4,74 <sup>b</sup>	0,343	<0,001
Leveduras (log <sub>10</sub> ufc g <sup>-1</sup> )	4,24	3,80	3,57	2,47	0,444	0,069
FF (log <sub>10</sub> ufc g <sup>-1</sup> )	1,79	1,46	1,49	1,10	0,307	0,492
PMS (%)	6,45 <sup>ab</sup>	5,36 <sup>ab</sup>	8,38 <sup>a</sup>	2,71 <sup>b</sup>	1,086	0,015
Estabilidade aeróbia (h)	40,8 <sup>b</sup>	49,0 <sup>b</sup>	67,0 <sup>b</sup>	161 <sup>a</sup>	16,879	<0,001
Deterioração aeróbia (°C)	12,8 <sup>a</sup>	8,40 <sup>ab</sup>	6,26 <sup>b</sup>	-0,88 <sup>c</sup>	1,247	<0,001

BAL, bactérias ácido láticas; CSA, carboidratos solúveis em água; EPM, erro padrão das médias; FDN, fibra em detergente neutro; FF, fungos filamentosos; MS, matéria seca; N-NH<sub>3</sub>, nitrogênio amoniacal; PB, proteína bruta; PMS, perdas de matéria seca; P valor, valor da probabilidade para o efeito dos tratamentos.

<sup>1</sup>Análise estatística não realizada.

Na Figura 1 estão apresentados os valores de pH ao longo da exposição ao ar. No segundo dia de aerobiose o pH das silagens foi muito semelhante ao pH no momento da abertura e as silagens tratadas com LBI mostraram maior valor que os demais tratamentos ( $P < 0,05$ ). No quarto dia o pH das silagens com SB foi inferior ao pH das silagens controle C e LBC ( $P < 0,05$ ). No sexto, oitavo e decimo dia houve tendência de menor pH das silagens tratadas com SB ( $P =$

0,073; P = 0,060; P = 0,107). Enquanto que no décimo segundo dia os valores foram similares em ambos os tratamentos (P = 0,763).



**Figura 1** Valores de pH ao longo de 12 dias de exposição ao ar das silagens tratadas ou não com aditivos (Experimento 1). C, controle; LBC, *L. buchneri* cepa CNCM-4323(LBC); LBI, *L. buchneri* cepa indígena; SB, benzoato de sódio.

## Experimento 2

A qualidade fermentativa, composição química, microbiana das silagens e estabilidade aeróbia estão apresentados na Tabela 4. O conteúdo de MS das silagens variou de 25,8 a 29,1% e as silagens tratadas com SB apresentaram valores significativamente maiores que C e LBC. As silagens tratadas com SB apresentaram valores de pH superiores (4,13) quando comparado aos demais tratamentos (média de 3,78). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos nas variáveis ácidos lático e etanol. As silagens tratadas com SB apresentaram menor concentração de ácido acético que os demais tratamentos. A silagem controle teve maior concentração de ácido butírico que o SB (P > 0,05).

A população de BAL foi inferior nas silagens tratadas com SB frente às outras silagens. As populações de leveduras e fungos filamentosos apresentaram valores inferiores a  $2 \log \text{ufc g}^{-1}$  em todos os tratamentos. O conteúdo de FDN, PB e N-NH<sub>3</sub> foram similares entre os tratamentos. Maior recuperação de CSA foi observada nas silagens tratadas com SB ( $P < 0,05$ ). O uso de SB na superfície do silo potencializou a estabilidade aeróbia das silagens, sendo superior aos tratamentos C, LBI e LBC.

**Tabela 4** Qualidade fermentativa, composição microbiológica, química e estabilidade aeróbia das silagens controle (C), tratadas com *L. buchneri* comercial (LBC), *L. buchneri* indígena (LBI) e benzoato de sódio (SB) (Experimento 2).

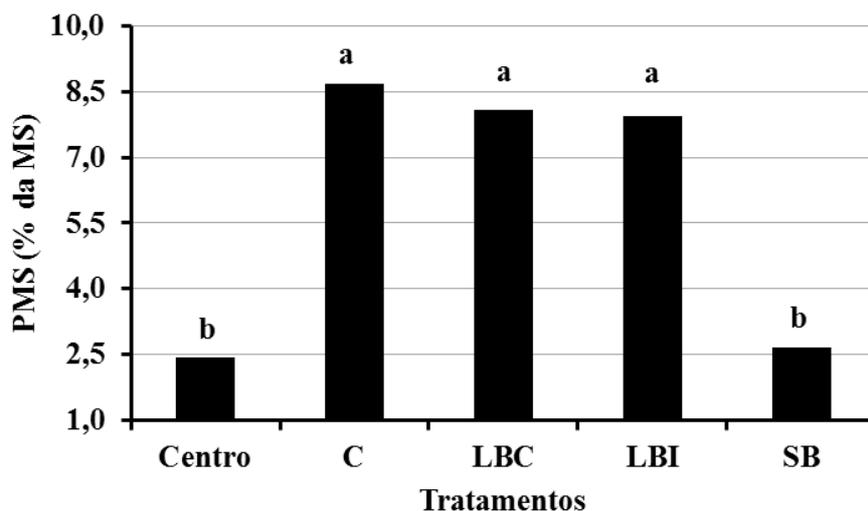
Variáveis	Tratamentos				EPM	P valor
	C	LBC	LBI	SB		
MS (%)	26,0 <sup>b</sup>	25,8 <sup>b</sup>	27,1 <sup>ab</sup>	29,1 <sup>a</sup>	0,639	0,019
FDN (% da MS)	53,5	55,5	55,1	50,5	2,039	0,411
PB (% da MS)	6,75	7,15	7,27	6,93	0,266	0,515
N-NH <sub>3</sub> (% da MS)	11,8	11,2	10,9	8,20	0,871	0,108
CSA (% da MS)	0,66 <sup>b</sup>	0,41 <sup>b</sup>	0,50 <sup>b</sup>	3,80 <sup>a</sup>	0,210	<0,001
pH	3,77 <sup>b</sup>	3,75 <sup>b</sup>	3,83 <sup>ab</sup>	4,13 <sup>a</sup>	0,078	0,024
Ácido lático (% da MS)	7,19	5,70	5,55	4,47	1,410	0,615
Ácido acético (% da MS)	1,50 <sup>a</sup>	1,39 <sup>a</sup>	1,65 <sup>a</sup>	0,59 <sup>b</sup>	0,115	<0,001
Ácido propiônico (% da MS)	1,46 <sup>a</sup>	1,33 <sup>a</sup>	1,21 <sup>a</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,150	<0,001
Ácido butírico (% da MS)	0,19 <sup>a</sup>	0,06 <sup>ab</sup>	0,06 <sup>ab</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,038	0,053
Etanol (% da MS)	1,20	1,03	1,11	1,05	0,138	0,828
BAL ( $\log_{10} \text{ufc g}^{-1}$ )	6,04 <sup>a</sup>	6,64 <sup>a</sup>	5,88 <sup>a</sup>	2,42 <sup>b</sup>	0,254	<0,001
Leveduras ( $\log_{10} \text{ufc g}^{-1}$ )	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	- <sup>1</sup>	-
FF ( $\log_{10} \text{ufc g}^{-1}$ )	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	-	-
Estabilidade aeróbia (h)	92,2 <sup>b</sup>	141 <sup>b</sup>	101 <sup>b</sup>	261 <sup>a</sup>	26,212	0,005

BAL, bactérias ácido láticas; CSA, carboidratos solúveis em água; EPM, erro padrão das médias; FDN, fibra em detergente neutro; FF, fungos filamentosos; MS, matéria seca; N-NH<sub>3</sub>, nitrogênio amoniacal; PB, proteína bruta; PMS, perdas de matéria seca; P valor, valor da probabilidade para o efeito dos tratamentos.

<sup>1</sup>Análise estatística não realizada.

Os aditivos avaliados influenciaram nas PMS das silagens (Figura 2). As menores perdas ocorreram no centro do silo trincheira e na superfície tratada com o aditivo SB ( $P < 0,05$ ), com valores de 2,44 e 2,67%, respectivamente. As

demais áreas da superfície tratadas com LBI, LBC e não tratadas apresentaram perdas de 7,97; 8,08 e 8,68%.



**Figura 2** Efeito dos aditivos sobre as perdas de matéria seca (PMS) no experimento 2. C, controle; LBC, *L. buchneri* cepa CNCM-4323(LBC); LBI, *L. buchneri* cepa indígena; SB, benzoato de sódio.  $P < 0,001$ , EPM = 1,036.

## DISCUSSÃO

As silagens tratadas com LBI apresentaram predominância da fermentação heterolática, resultando em um aumento na concentração de ácido acético e diminuição nos teores de ácido lático comparado com o ácido lático (experimento 1). O maior valor de pH observado nas silagens tratadas com LBI é explicado pelo menor poder de acidificação do ácido acético (PAHLOW et al., 2003). A intensificação da fermentação heterolática gera um aumento nas perdas pela produção de  $\text{CO}_2$  durante o metabolismo do ácido acético e de outros produtos (OUDE ELFERINK et al., 2001). Este aumento na produção de  $\text{CO}_2$  pode levar a um aumento nas PMS das silagens tratadas com *L. buchneri* em

relação as não tratadas (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOLESTRA, 1999; DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; VAN WIKSELAAR, 2001). Resultado encontrado no experimento 1, onde as silagens com LBI apresentaram numericamente maiores PMS (8,38 %) em relação ao C (6,45 %) e estatisticamente em relação ao SB (2,71 %).

Numericamente o LBI apresentou no experimento 1 uma menor contagem de leveduras (3,57), maior estabilidade aeróbia (67 h) e estatisticamente menor deterioração aeróbia (6,26°C) em relação ao controle (4,24; 40,8 h e 12,8°C). As 26 horas a mais de estabilidade aeróbia, proporcionada pelo LBI em relação ao controle, embora não tenha diferido estatisticamente, são importantes em nível de campo. Aumento na estabilidade aeróbia de silagens tratadas com cepas de *L. buchneri* também pode ser encontrado em outros trabalhos (MARI et al., 2009; TABACCO et al., 2011b). A maior estabilidade do LBI está ligada a maior ação antifúngica do ácido acético, quando comparada ao ácido láctico (KLEINSCHMIT, SCHMIDT; KUNG, 2005; TABACCO et al., 2011a). Na meta-análise de 43 experimentos realizada por Kleinschmit e Kung (2006) observou-se que silagens tratadas com *L. buchneri* decresciam a concentração de ácido láctico, aumentavam a concentração de ácido acético, diminuíam a contagem de leveduras e aumentavam a estabilidade aeróbia em relação ao controle, sendo estas características comuns ao inoculantes com este gênero de bactéria ácido láctica.

Recomendações praticas de campo sugerem que a relação ácido láctico:acético desejável é 3:1 (KUNG; STOKES, 2001) o que poderia ser um indicio de uma maior fermentação homoláctica. Apesar da silagem tratada com LBI ter apresentado uma relação ácido láctico:acético de apenas 2,5, o nitrogênio amoniacal permaneceu baixo e a concentração de ácido butírico não foi alterada, o que indica ausência de fermentações secundárias. A deterioração aeróbia inferior do LBI em relação ao C é outro indicio de que a baixa relação ácido

lático:acético não impactou negativamente a qualidade da silagem. Resultados semelhantes foram encontrados por Kleinschmit e Kung (2006).

Durante o metabolismo do *L. buchneri* pode ser produzido além do ácido acético o 1,2-propanodiol (OUDE ELFERINK et al., 2001). O 1,2-propanodiol pode posteriormente ser convertido em 1-propanol e ácido propiônico pelo *Lactocacillus diolivoras*, presente na massa ensilada (KROONEMAN et al., 2002). Portanto, o aumento numérico na concentração de ácido propiônico observado no experimento 1 pode estar relacionado a este evento.

A eficiência dos inoculantes biológicos para silagens podem ser afetados pelas altas temperaturas nas etapas de ensilagem, armazenamento e desabastecimento do silo (ASHBELL et al., 2002; WEINBERG et al., 2001). Durante os cinco dias, após a ensilagem, a temperatura interna da massa nas regiões periféricas do silo trincheira foi em média 37,2°C (dados não mostrados). Weinberg et al. (2001) observaram em um experimento onde as silagens foram mantidas em salas com constantes temperaturas (28°C), constantes e altas temperaturas (37°C) e variadas temperaturas (41-37-28°C) que a contagem de BAL e o efeito do inoculante foram menores nas altas temperaturas em relação à temperatura mais baixa (28°C). Portanto as altas temperaturas iniciais da silagem podem ter atrapalhado o desempenho dos aditivos biológicos no experimento 2.

Segundo Muck (2012), o uso de inoculantes advindos de cepas isoladas de gramíneas, milho e leguminosas de países de clima temperado podem não ter o mesmo efeito quando usadas em regiões de clima quente. Esta talvez seja uma explicação para o desempenho insatisfatório do LBC, embora o uso de cepas nativas nem sempre seja mais eficiente que cepas isoladas em outros ambientes (Ávila et al., 2011).

Assim como no experimento 1, alguns outros trabalhos têm indicado resultados positivos com o uso de cepas indígenas. Saarisalo (2007), estudando o processo de triagem de cepas homofermentativas com potencial antifúngico para gramíneas, observou quatro cepas que aumentaram a qualidade fermentativa e diminuíram as PMS em relação ao controle. Ávila et al. (2009) identificaram cepas de *L. buchneri* que formam melhores que cepas comerciais em reduzir concentração de etanol e contagem de leveduras, o que aumentou a estabilidade aeróbia em silagem de cana-de-açúcar. Penteado et al. (2007) encontraram melhora no perfil fermentativo, favorecimento do desenvolvimento de bactérias lácticas e menores PMS na silagem de capim-mombaça inoculada com cepas isoladas da própria planta.

A alta relação ácido láctico:acético (12,2 e 7,58 nos experimento 1 e 2, respectivamente) das silagens tratadas com SB indica uma predominância de fermentações do tipo homolática (KUNG; STOKES, 2001). Woolford (1975), estudando a ação de agentes antimicrobianos sobre a preservação da silagem e triagem de microrganismos, encontrou uma tendência de maior inibição de BAL heterofermentativas nos tratamentos com benzoato de sódio. A menor contagem total de BAL, menor PMS e maior recuperação de CSA sugerem uma parcial inibição da fermentação nas silagens tratadas com SB. Efeito similar ao observado por Kleinschmit, Schmidt e Kung (2005). Entretanto, no presente trabalho houve um acentuado aumento nos teores de ácido láctico (experimento 1), comportamento diferente do observado por estes autores, que não encontraram influência do benzoato de sódio e do sorbato de potássio sobre a concentração de ácido láctico. Indica que não houve inibição da fermentação no experimento 1 e, sim, uma seleção de cepas mais eficientes de BAL homofermentativas.

O benzoato de sódio apresenta um comprovado efeito antimicrobiano (KLEINSCHMIT; SCHMIDT; KUNG, 2005; LAMBERT; STRATFORD,

1999; WOOLFORD, 1975). No experimento 1 houve uma tendência de diminuição na contagem de leveduras para as silagens tratadas com SB o que refletiu em um menor teor de etanol, menor deterioração aeróbia e maior estabilidade aeróbia e a estabilidade aeróbia foi maior em ambos os experimentos. Resultados semelhantes foram encontrados por Conaghan, O’Kiely e O’Mara (2010); Lingvall e Lattema (1999); Muller (2005), quando estudaram o uso de misturas contendo hexaminas, nitrato de sódio, benzoato de sódio e propionato de sódio como aditivos para silagem. Knicky e Spörmndly (2009; 2010) também observaram diminuição de microrganismos indesejáveis, melhoria na qualidade higiênica da silagem independente na MS, diminuição de PMS e aumento da estabilidade aeróbia em silagem com alta MS. Entretanto, estes autores trabalharam com misturas de aditivos que continham benzoato de sódio, sorbato de potássio e nitrato de sódio. Kleinschmit, Schmidt e Kung (2005) também observaram os mesmos efeitos positivos em silagens de milho tratadas somente com benzoato de sódio. Indica que o uso exclusivo de benzoato de sódio pode ser tão eficiente quanto o uso de misturas de aditivos químicos. Silagens tratadas com SB apresentaram maior controle do aumento de pH ao longo dos dias, que também é um indicio de maior estabilidade aeróbia. O SB proporcionou uma maior recuperação de CSA, menor concentração de N-NH<sub>3</sub> e menores PMS em ambos os experimentos. No experimento 2, as PMS da superfície tratada com SB foram semelhantes as PMS do centro do silo. Portanto, o SB proporcionou maior conservação dos nutrientes da silagem.

Bactérias ácido butíricas, como *Clostridium*, podem se desenvolver em silagens com baixos teores de MS, levando a fermentações secundárias que geram perdas de MS e formação de produtos indesejados como ácido butírico (PAHLOW et al., 2003). No presente estudo a silagem não tratada no experimento 2, apresentou uma quantidade de ácido butírico mais alta que a silagem tratada com SB, enquanto LBC e LBI apresentaram valores

intermediários. Sugerem que, em função da baixa MS encontrada no topo do silo trincheira (27,0%), quando comparadas ao centro do silo (34,3%), causada pela forma de aplicação dos tratamentos, pode ter havido o desenvolvimento de bactérias ácido butíricas. O SB foi eficiente em controlar estas fermentações indesejadas, seu uso resultou em silagens com baixa concentração de ácido butírico e N-NH<sub>3</sub>, mesmo em condições de baixa MS. Comportamento semelhante ao encontrado por Knicky e Spörndly (2005) quando trabalharam com aditivos químicos em culturas com diferentes teores de MS.

No experimento 2 a contagem de leveduras e fungos ficou abaixo do nível de detecção. Resultado este inesperado e contrário a outros existentes na literatura, que demonstram uma maior carga microbiana nas regiões periféricas dos silos trincheira (VISSERS et al., 2007). Duas das quatro parcelas do tratamento C tiveram estabilidade aeróbia de mais de 100 h. A contagem de leveduras a níveis não detectados e a alta estabilidade aeróbia, mesmo no controle, podem ser explicadas pelas práticas de manejo na ensilagem do experimento 2, que proporcionaram uma alta densidade da MS ( $561 \pm 44 \text{ kg m}^{-3}$  no centro do silo e  $535 \pm 55 \text{ kg m}^{-3}$  nas áreas periféricas). Em alguns estudos têm sido relatado que altas densidades da silagem estão correlacionadas com aumento do tempo que a silagem pode ficar exposta ao ar antes de se desestabilizar (MUCK; MOSER; PITT, 2003; RUPPEL et al., 1995; TABACCO et al., 2011a).

#### **4 CONCLUSÃO**

A cepa indígena de *L. buchneri* promoveu fermentação acética, apresentando melhores resultados que o controle.

O benzoato de sódio, aplicado na concentração de 0,2%, foi o aditivo mais eficaz neste estudo, pois proporcionou silagens com melhor qualidade fermentativa, maior concentração de carboidratos solúveis residuais e menores perdas, combinado com prolongada estabilidade aeróbia.

## REFERÊNCIAS

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists**. 15. ed. Arlington: [AOAC], 1990. 1117 p.

ASHBEL, G.; KASHANCI, Y. In silo losses from wheat ensiled in bunker silos in a subtropical climate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 40, n. 2, p. 95-103, 1987.

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.

ÁVILA, C. L. S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 384-394, dec. 2009.

ÁVILA, C. L. S. et al. Potential use of native microorganisms strains of forage for silage production. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2011. p. 25-44.

BERNARDES, T. F. **Levantamento das práticas de produção e uso de silagens em fazendas produtoras de leite no Brasil**. Lavras: Milkpoint: UFLA, 2012. Disponível em: <<http://www.Milkpoint.com.br/pdf/EBOOK-SILAGEM.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

BOLSEN, K. K. Issues of top spoilage losses in horizontal silos. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK, 1., 1997, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: [s.n.], 1997. p. 137-150.

BOLSEN, K. K.; WHITLOCK, L. A.; URIARTE-ARCHUNDIA, M. E. Effect of surface spoilage on the nutritive value of maize silage diets. In:

INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 2002, Auchincruive.  
**Proceedings...** Auchincruive, Scotland: [Cornell University], 2012. p. 76-77.

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.

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, 2003. Cap. 5, p. 199-250. (Agronomy, 42).

CARVALHO, B. F. et al. Effects of propionic acid and *Lactobacillus buchneri* (UFLA SIL 72) addition on fermentative and microbiological characteristics of sugar cane silage treated with and without calcium oxide. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 67, n. 4, p. 462-47, dec. 2012.

CONAGHAN, P.; O'KIELY, P.; O'MARA, F. P. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 2, p. 628-643, feb. 2010.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-512.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOLESTRA, 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**, Oxford, v. 87, n. 4, p. 583-594, out. 1999.

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

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

KLEINSCHMIT, D. H.; SCHMIDT, R. J.; KUNG, L. JUNIOR. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 6, p. 2130-2139, jun. 2005.

KNICKY, M.; SPÖRNDLY, R. Sodium benzoate, potassium sorbate and sodium nitrite as silage additives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 89, n. 15, p. 2659-2667, dec. 2009.

KNICKY, M.; SPÖRNDLY, R. The ensiling capability of a mixture of sodium benzoate, potassium sorbate, and sodium nitrite. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 2, p. 824-831, feb. 2011.

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

KUNG, L. JUNIOR; STOKES, M. R. **Analyzing silages for fermentation end products, 2001**. [Newark: College of Agriculture & Natural Resources], 2001. Disponível em: <[http://ag.udel.edu/departments/anfs/faculty/USE OF AN ANTIFUNGAL SILAGE INOCULANT 4013 kung/articles/analyzing\\_silages\\_for\\_fermentati.htm](http://ag.udel.edu/departments/anfs/faculty/USE_OF_AN_ANTIFUNGAL_SILAGE_INOCULANT_4013_kung/articles/analyzing_silages_for_fermentati.htm)>. Acesso em: 20 ago. 2012.

KUNG, L. JUNIOR; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H (Co-ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA, 2003. Cap. 7, p. 305-360. (Agronomy, 42).

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.

LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICH, A. J. A simple method for the analysis of particle size of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 5, p. 922-928, may. 1996.

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], 2002. p. 503-511.

LINGVALL, P.; LATTEMAE, P. Influence of hexamine and sodium nitrite in combination with sodium benzoate and sodium propionate on fermentation and hygienic quality of wilted long cut grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 2, p. 257-264, feb. 1999.

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

McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. Microorganisms. In: McDonALD, P. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Aberystwyth, UK: Chalcombe Publications, 1991. p. 81-152.

McLAUGHLIN, N. B.; WILSON, D. B.; BOWDEN, D. M. Effect of a plastic cover on dry matter loss from a horizontal silo. **Canadian Agricultural Engineering**, Ottawa, v. 20, n. 1, p. 1-4, jun. 1978.

MORAN, J. P. et al. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11., 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth: [IGER], 1996. p. 162-163.

MUCK, R. E.; HOLMES, B. J. Factors affecting bunker silo densities. **Applied Engineering in Agriculture**, St. Joseph, v. 16, n. 6, p. 613-619, nov. 2000.

MUCK, R. E. Microbiology of ensiling. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012, Hameenlinna. **Proceedings...** Hameenlinna, Finland: MTT Agrifood Research Finland University of Helsinki, 2012. p. 75-86.

MÜLLER, C. E. Fermentation patterns of small-bale silage and haylage produced as a feed for horses. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 109-118, jun. 2005.

NOEL, R. J.; HAMBLETON, L. G. Collaborative study of a semiautomated method for determination of crude protein in animal feeds. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 59, n. 1, p. 134-140, 1976.

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, DC, v. 67, n. 1, p. 125-132, 2001.

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, 2003. Cap. 2, p. 31-93. (Agronomy, 42).

PENTEADO, D. C. S. et al. *Lactobacillus plantarum* from microbiota as inoculant for *Panicum maximum* silage. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 56, n. 214, p. 191-202, jun. 2007.

PITT, R. E. **Silage and hay preservation**. Ithaca: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1990. p. 53. NRAES-5.

QUEIROZ, O. C. M.; RABAGLINO, M. B.; ADESOGAN, A. T. Mycotoxins in silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND

CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2011. p. 105-126.

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, jan. 1995.

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, 2007.

SAS - STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **User's guide**. Version 8. Cary, 2000. 1 CD-ROM.

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.

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. 2011a.

TABACCO, E. et al. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 3, p. 1409-1419, mar. 2011b.

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

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, feb. 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, apr. 2001.

WILKINSON, J. M.; TOIVONEN, M. I. **World silage**. Southampton, UK: Chalcombe Publications, 2003.

WOOLFORD, M. K. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 26, n. 3, p. 229-235, mar. 1975.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. 4. ed. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 350.