**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização microbiológica, parâmetros fermentativos e
estabilidade aeróbia em silagens de forragens tropicais com
aditivos microbianos**

Adir de Sá Neto

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens**

**Piracicaba
2012**

Adir de Sá Neto
Zootecnista

Caracterização microbiológica, parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia em silagens de forragens tropicais com aditivos microbianos

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ GUSTAVO NUSSIO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Sá Neto, Adir de

Caracterização microbiológica, parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia em silagens de forragens tropicais com aditivos microbianos / Adir de Sá Neto. - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - Piracicaba, 2012.

115 p: il.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Cana-de-açúcar 2. Ensilagem 3. Capim elefante 4. Fermentação 5. Lactobacillus 6. Milho I. Título

CDD 636.08552
S111c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Em especial à minha amada namorada, Maity, por todo seu amor e amizade dedicada a mim.

Com muito amor, DEDICO

OFEREÇO para meu Tio André

Com sua inocência, ensinando lições de amor, afeto e união

Foi por querer, ou de propósito ? ? ?

AGRADECIMENTOS

À minha família, a base de tudo. Agradeço imensamente aos meus pais, Orlando e Nadia, por todos os ensinamentos, valores, apoio e por acreditarem no meu potencial. Às minhas irmãs, Priscila e Patricia, amadas e eternas companheiras. Agradeço ao amor incondicional que recebo. Tenho a certeza que sem vocês não teria conseguido! Realmente, sou privilegiado por pertencer a essa família!!!

Especialmente, à Maity, por todo apoio, cumplicidade, pelos momentos que passamos juntos durante esse período. Pelas infinitas correções e ajuda durante a fase de redação. AMO VOCÊ!

Às minha avós, Ivete e Regina, por todo apoio e amor. Agradeço a meus avôs Zeni e Titê, pela ajuda nas horas que pensei em desistir, pela força que me faz seguir em frente e pelo exemplo que foram.

Aos meus amigos, Cadu, Ari, André e Bueno, pelo apoio e momentos de descontração.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade e apoio.

Ao Professor Luiz Gustavo Nussio, pelo exemplo que é, pela amizade e apoio em todas as etapas. Agradeço por todas as oportunidades e pelo meu crescimento profissional e, sobretudo, pessoal.

Aos integrantes e ex integrantes do Grupo de estudo em Qualidade e Conservação de Forragens, QCF-ESALQ/USP: Rafael, João, Álvaro, Daniel, Edward, Juliana, Greici, Cristiano, Janaina, Sentença, Toki-Mágico, Matão, 100-Kina, Soldadiño, Agradeço pelo convívio durante esses anos e apoio em todas as atividades experimentais e extra acadêmicas.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia: Juscelino, Emerson, Seu Lauriano, Néco, Vagner, Pomba, por toda colaboração durante os experimentos de campo. Especialmente ao César e a Taninha pela amizade e ajuda durante as atividades.

À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

À Lallemand Animal Nutrition e DeLaval pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma maneira, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Microrganismos na silagem.....	25
2.1.1 Flora epífita das plantas	25
2.1.2 Bactérias ácido lácticas.....	25
2.1.2.1 Espécies do gênero <i>Lactobacillus</i>	26
2.1.3 Bactérias do gênero <i>Clostridium</i>	27
2.1.4 Fungos	29
2.1.4.1 Leveduras.....	29
2.1.4.2 Fungos filamentosos	31
2.2 Aditivos para silagem	31
2.2.1 Inoculantes bacterianos.....	32
2.3 Tempo de armazenamento	33
Referências	34
3 DETERIORAÇÃO AERÓBIA EM SILAGENS DE MILHO SOB DOSES CRESCENTES DE <i>Lactobacillus buchneri</i> EM DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO	39
Resumo.....	39
Abstract	40
3.1 Introdução	41
3.2 Material e Métodos.....	42

3.2.1 Ensilagem e tratamentos	42
3.2.2 Abertura dos silos experimentais	43
3.2.3 Amostragens e variáveis analisadas na forragem fresca.....	43
3.2.4 Perdas de matéria seca durante o armazenamento	45
3.2.5 Amostragens e variáveis analisadas na silagem	47
3.2.6 Características da forragem no momento da ensilagem.....	47
3.2.7 Estabilidade aeróbia das silagens.....	48
3.2.8 Análises estatísticas	49
3.3 Resultados.....	50
3.3.1 Características fermentativas e microbiológicas das silagens	50
3.3.2 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos	54
3.3.3 Perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens	59
3.4 Discussão	69
3.4.1 Características da forragem no momento da ensilagem.....	69
3.4.2 Características fermentativas e microbiológicas das silagens	70
3.4.3 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos	72
3.4.4 Perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens	73
Referências.....	76
4 <i>Lactobacillus buchneri</i> EXCLUSIVO OU ASSOCIADO AO <i>Lactobacillus plantarum</i> EM SILAGENS DE FORRAGENS TROPICAIS.....	81
Resumo	81
Abstract.....	82
4.1 Introdução.....	83
4.2 Material e Métodos	84
4.2.1 Ensilagem e tratamentos	84
4.2.2 Amostragens e variáveis analisadas na forragem fresca.....	86
4.2.3 Perdas de matéria seca durante o armazenamento	87

4.2.4 Amostras e variáveis analisadas na silagem	89
4.2.5 Características da forragem no momento da ensilagem	89
4.2.5.1 Milho	90
4.2.5.2 Cana-de-açúcar	90
4.2.5.3 Capim	91
4.2.6 Estabilidade aeróbia das silagens	92
4.2.7 Análises estatísticas	92
4.3 Resultados	93
4.3.1 Silagem de milho	93
4.3.1.1 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos	93
4.3.1.2 Características fermentativas e microbiológicas das silagens	94
4.3.1.3 Perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens	94
4.3.2 Silagem de cana-de-açúcar	96
4.3.2.1 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos	96
4.3.2.2 Características fermentativas e microbiológicas das silagens	97
4.3.2.3 Perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens	97
4.3.3 Silagem de capim elefante cv. Napier	99
4.3.3.1 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos	99
4.3.3.2 Características fermentativas e microbiológicas das silagens	100
4.3.3.3 Perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens	100
4.4 Discussão	102
4.4.1 Silagem de milho	102
4.4.2 Silagem de cana-de-açúcar	104
4.4.3 Silagem de capim elefante cv. Napier	106
4.5 Conclusões	107
Referências	107
5 CONCLUSÕES GERAIS	113

RESUMO

Caracterização microbiológica, parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia em silagens de forragens tropicais com aditivos microbianos

Foram realizados dois experimentos para avaliação de aditivos microbianos na ensilagem de forragens tropicais. No primeiro experimento avaliou-se o efeito de doses crescentes de *Lactobacillus buchneri*, em diferentes tempos de armazenamento, sobre o valor nutritivo, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia de silagens de milho. No segundo experimento avaliou-se o efeito de *L. buchneri*, de forma exclusiva, ou em combinação com *Lactobacillus plantarum*, em silagens de milho, cana-de-açúcar e capim elefante cv. Napier. O tratamento das silagens de milho com *L. buchneri* não afetou a contagem de fungos filamentosos, com decréscimo nas contagens com maiores tempos de armazenamento. Os teores de ácido láctico decresceram com o aumento da dose de *L. buchneri*. Os maiores períodos de armazenamento resultaram em decréscimo na contagem de BAL, e maiores valores de pH. O tempo de armazenamento diminuiu as leveduras na silagem de milho. Maiores tempos de armazenamento propiciaram maiores tempos para atingir a temperatura máxima e a perda da estabilidade aeróbia. As silagens com doses superiores de *L. buchneri* apresentaram perda de estabilidade em momento posterior às silagens dos tratamentos controle e LB1x10⁵. O maior tempo de armazenamento da silagem de milho resultou em maior valor nutritivo e perfil microbiológico favorável quanto à fermentação e estabilidade em aerobiose. Inoculação com *L. buchneri* (NCIMB 40788) reduz a sobrevivência de leveduras durante a fase de armazenamento e o crescimento durante a exposição ao oxigênio, melhorando a estabilidade aeróbia da silagem em ambiente tropical. Doses mais elevadas poderiam compensar parcialmente o menor tempo de armazenamento das silagens. No segundo experimento, o tratamento das silagens de milho com *L. buchneri* (LB), exclusivamente, ou associado com *L. plantarum* (LB+LP) não afetou as variáveis relacionadas com o valor nutritivo das silagens. As concentrações de ácido acético nas silagens de milho foram superiores no tratamento controle. Nas silagens de cana-de-açúcar, o tratamento LB apresentou maiores teores de MS e DVIVMO. O tratamento controle apresentou maior população de bactérias ácido lácticas, e menor valor de pH. A silagem de cana-de-açúcar sem aditivo atingiu o pico de temperatura após o tratamento LB, sendo esse pico superior na silagem aditivada. Foram observadas menores perdas de matéria seca e produção de gases nas silagens aditivadas, resultando assim em maior recuperação de MS no tratamento LB. Foi observado maior tempo para atingir a temperatura máxima e menor acúmulo de temperatura até o quinto dia de exposição aeróbia no tratamento controle. A temperatura máxima atingida durante a exposição aeróbia foi superior no tratamento LB. Nas silagens de capim, as silagens do tratamento LB+LP apresentaram maiores teores de MS, e menor teor de PB. Foi observada maior população de bactérias ácido lácticas nas silagens do tratamento LB+LP. A inoculação com *L. buchneri*, sozinho, ou em associação com *L. plantarum* não foi eficiente em melhorar a qualidade e estabilidade aeróbia das forragens avaliadas.

Palavras-chave: *Lactobacillus buchneri*; *Lactobacillus plantarum*; Milho; Cana-de-açúcar; Capim elefante cv. Napier

ABSTRACT

Microbiologic characterization, fermentative parameters and aerobic stability of tropical forage silages with microbial additives

Two trials were conducted for the evaluation of microbial additives on tropical forages ensiling. At the first trial the effect of increasing *L. buchneri* doses, and different storage periods on the fermentation profile, aerobic stability and nutritive value of corn silage were evaluated. At the second trial the effect of *L. buchneri* with or without *L. plantarum* was evaluated on the fermentation profile, aerobic stability and nutritive value of corn, sugarcane and tropical grass silages. Silages inoculation with *L. buchneri* did not affect the filamentous fungi counts, with decreased counts with higher storage periods. Lactic acid content was influenced only by treatment, with decrease in concentrations as the *L. buchneri* dose increased. Lactic acid bacteria, yeasts, pH, butyric and acetic acid were influenced by both treatment and storage period. Higher storage periods resulted in decreased LAB counts and higher pH values. Storage time decreased yeast count in corn silage. For the dry matter losses, gas losses and maximum temperature there was no treatment effect, only storage period effect, decreasing along time. It was observed an increase in effluent production with higher storage time. Time to reach maximum temperature, AC5 and AC10 were influenced by both treatment and storage period. Higher storage periods resulted in higher time to reach the maximum temperature and to break the aerobic stability. Silages with the higher *L. buchneri* doses showed stability breakdown after control and $LB1 \times 10^5$ silages. The higher storage period of corn silages resulted in higher nutritive value and microbial profile favorable to the fermentation and stability during aerobic exposure. Inoculation with *Lactobacillus buchneri* (NCIMB 40788) reduces the survival of yeasts during the storage phase, and its growth during oxygen exposure, improving silage aerobic stability in tropical regions. Higher doses could partly compensate the lower storage time in silages. In the second trial, inoculation of corn silages with *L. buchneri* (LB), alone or in association with *L. plantarum* (LB+LP) did not affect the variables related to the silage nutritive value. Acetic acid content of corn silages was higher for the control treatment. In sugarcane silages, LB treatment showed higher DM content and IVTOMD. Control treatment showed higher lactic acid bacteria counts, and lower pH. Sugarcane silage with no additive reached temperature peak after LB treatment, with this peak being higher at the additivated silage. There were observed lower dry matter losses and gas production in LB silages, resulting in higher dry matter recovery. It was observed higher time to reach maximum temperature and lower temperature accumulation until fifth day of aerobic exposure for the control treatment. Maximum temperature reached during aerobic exposure was higher for LB treatment. In tropical grass silages, LB+LP silages showed higher DM and lower CP contents. It was observed higher lactic acid bacteria in LB+LP treatment. Inoculation with *L. buchneri*, alone or in association with *L. plantarum* was not efficient in improving quality and aerobic stability of evaluated forages.

Keywords: *Lactobacillus buchneri*; *Lactobacillus plantarum*; Corn; Sugarcane; Tropical grass

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Extrato etéreo e matéria mineral das silagens de milho nos diferentes tempos de armazenamento.....	55
Figura 2 - Digestibilidade verdadeira <i>in vitro</i> da matéria orgânica, fibra em detergente neutro e celulose de silagens de milho em diferentes tempos de armazenamento.....	58
Figura 3 - Digestibilidade verdadeira <i>in vitro</i> da matéria orgânica, fibra em detergente neutro e celulose de silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i>	58
Figura 4 - Teor de amido e N-FDA de silagens de milho em diferentes tempos de armazenamento.....	59
Figura 5 - Teor de amido e N-FDA de silagens de milho tratadas com diferentes doses de <i>L. buchneri</i>	59
Figura 6 - Variação temporal da temperatura durante a exposição aeróbia de silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> com 15 dias de armazenamento	61
Figura 7 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbia de silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> com 60 dias de armazenamento.....	62
Figura 8 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbia de silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> com 90 dias de armazenamento.....	62
Figura 9 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbia de silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> com 150 dias de armazenamento.....	63
Figura 10 - Evolução do pH durante exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> com 15 dias de armazenamento ..	67
Figura 11 - Evolução do pH durante exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> com 60 dias de armazenamento ..	68
Figura 12 - Evolução do pH durante exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> com 90 dias de armazenamento ..	68
Figura 13 - Evolução do pH durante exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> com 150 dias de armazenamento ..	69

Figura 14 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbia de silagens de milho inoculadas com <i>L. buchneri</i> e <i>L. plantarum</i>	95
Figura 15 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbia de silagens de cana-de-açúcar tratadas com <i>L. buchneri</i> após 150 de armazenamento	98
Figura 16 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbia de silagens de capim elefante cv. Napier tratadas com <i>L. buchneri</i> e <i>L. plantarum</i> após 150 dias de armazenamento.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da forragem no momento da ensilagem	48
Tabela 2 - Estatística descritiva para variáveis relativas ao padrão de fermentação e microbiologia de silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento.....	50
Tabela 3 - Valor do pH no momento da abertura das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento.....	51
Tabela 4 - Teor de ácido acético (% MS) das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento	51
Tabela 5 - Teor de ácido butírico (% MS) das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento	52
Tabela 6 - Contagem de bactérias ácido lácticas em silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento.....	52
Tabela 7 - Contagens de leveduras em silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento	53
Tabela 8 - Contagens de fungos em silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento	53
Tabela 9 - Estatística descritiva para variáveis relativas ao valor nutritivo de silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento.....	54
Tabela 10 - Teor de matéria seca das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento	55
Tabela 11 - Teor de proteína bruta das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento	56
Tabela 12 - Teor de lignina das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento.....	56
Tabela 13 - Digestibilidade verdadeira <i>in vitro</i> da matéria seca das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento.....	56

Tabela 14 - Teor de fibra em detergente ácido das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento	57
Tabela 15 - Teor de hemicelulose das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento	57
Tabela 16 - Estatística descritiva para variáveis relativas às perdas e estabilidade aeróbia de silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento	60
Tabela 17 - Perdas de MS, recuperação de MS, perdas por gases e efluentes em silagens de milho em diferentes tempos de armazenamento	60
Tabela 18 - Temperatura máxima das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento, durante a exposição aeróbia.....	60
Tabela 19 - Tempo para atingir a temperatura máxima durante a exposição aeróbia das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento.....	63
Tabela 20 - Tempo para perda da estabilidade aeróbia das silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento	64
Tabela 21 - Temperaturas acumuladas aos 5 dias de exposição aeróbia nas silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento	64
Tabela 22 - Temperaturas acumuladas aos 10 dias de exposição aeróbia nas silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> em diferentes tempos de armazenamento.....	65
Tabela 23 - Contagens de leveduras durante a exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> após 15 dias de armazenamento	65
Tabela 24 - Contagem de leveduras durante a exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> após 90 dias de armazenamento	66
Tabela 25 - Contagem de leveduras durante a exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de <i>L. buchneri</i> após 150 dias de armazenamento	66

Tabela 26 - Características da forragem de milho no momento da ensilagem	90
Tabela 27- Valor nutritivo da cana-de-açúcar no momento da ensilagem	91
Tabela 28 - Valor nutritivo do capim no momento da ensilagem.....	92
Tabela 29 - Valor nutritivo de silagens de milho inoculadas com <i>L. buchneri</i> e <i>L. plantarum</i> no momento da abertura dos silos	93
Tabela 30 - Características fermentativas e microbiológicas das silagens de milho inoculadas com <i>L. buchneri</i> e <i>L. plantarum</i>	94
Tabela 31 - Perdas de matéria seca e variáveis analisadas durante a exposição aeróbia de silagens de milho inoculadas com <i>L. buchneri</i> e <i>L. plantarum</i>	96
Tabela 32 - Valor nutritivo de silagens de cana-de-açúcar inoculadas com <i>L. buchneri</i> no momento da abertura dos silos.....	96
Tabela 33 - Características fermentativas e microbiológicas de silagens de cana-de-açúcar inoculadas com <i>L. buchneri</i>	97
Tabela 34 - Perdas de matéria seca e variáveis analisadas durante a exposição aeróbia de silagens de cana-de-açúcar inoculadas com <i>L. buchneri</i>	99
Tabela 35 - Valor nutritivo de silagens de capim elefante cv. Napier no momento da abertura dos silos	100
Tabela 36 - Características fermentativas e microbiológicas de silagens de capim elefante cv. Napier tratadas com <i>L. buchneri</i> e <i>L. plantarum</i>	100
Tabela 37 - Perdas de matéria seca e variáveis analisadas durante a exposição aeróbia de silagens de capim elefante cv. Napier tratadas com <i>L. buchneri</i> e <i>L. plantarum</i>	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL – bactérias ácido lácticas

CEL – celulose

DVIVMO – digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica

DVIVMS – digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca

EE – extrato etéreo

FDA – fibra insolúvel em detergente ácido

FDN – fibra insolúvel em detergente neutro

HEMI – hemicelulose

LEV - leveduras

LIG – lignina

MM – matéria mineral

MS – matéria seca

MV – massa verde

PB – proteína bruta

UFC – unidade formadora de colônias

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo na conservação de forragens é preservar o valor nutritivo da planta para posterior utilização em períodos de escassez de alimento. A fenação e a ensilagem são alternativas de conservação, sendo a ensilagem a mais utilizada atualmente em nosso país.

Silagem representa a massa produzida por fermentação anaeróbia da planta, onde bactérias fermentam os açúcares da forragem principalmente até ácido láctico, resultando em queda acentuada do pH, controlando o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, como clostrídeos, enterobactérias, fungos e leveduras, responsáveis pelas perdas de valor nutritivo da massa ensilada, durante a fermentação e após a abertura do silo.

As plantas apresentam originalmente população epífita de microrganismos, que podem auxiliar na fermentação. No entanto, o uso de aditivos, principalmente inoculantes microbianos, tem o objetivo de garantir o domínio das bactérias ácido lácticas sobre a fermentação, já no início do processo.

Dentre os aditivos microbianos, as bactérias do gênero *Lactobacillus* são as mais estudadas e consolidadas no mercado, podendo ser divididas em homofermentativas (*Lactobacillus lactis*), heterofermentativas facultativas (*Lactobacillus plantarum*) ou heterofermentativas obrigatórias (*Lactobacillus buchneri*). As primeiras caracterizam-se por produção exclusiva de ácido láctico, enquanto as duas últimas produzem, além do ácido láctico, outros compostos como ácido acético, etanol e CO₂. Todos os gêneros apresentam importância no processo de ensilagem, tanto durante a fermentação como no período após a abertura do silo, e por isso são atualmente, os principais microrganismos encontrados nos produtos comerciais, de forma exclusiva ou combinados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microrganismos na silagem

2.1.1 Flora epífita das plantas

No momento da ensilagem, a planta apresenta população epífita composta tanto por microrganismos aeróbios como anaeróbios, representados por bactérias, leveduras e fungos (MUCK, 2010).

A população epifítica de forragens frescas varia de 10^6 a 10^9 ufc/g MV, sendo a grande maioria aeróbia estrita (PAHLOW et al., 2003). Bactérias ácido lácticas (BAL) estão normalmente presentes em número mil vezes menor que seus competidores, fungos e enterobactérias, mas podem se multiplicar rapidamente após o corte e picagem da forragem (LIN et al., 1992). Bactérias ácido lácticas são encontradas, em grande número, em partes danificadas das plantas, o que indica que possam proteger as plantas de microrganismos patogênicos por meio da produção de compostos antagonísticos como ácidos, bacteriocinas e agentes antifúngicos (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

2.1.2 Bactérias ácido lácticas

Bactérias ácido lácticas possuem a habilidade de produzir ácido láctico como principal produto. Seis gêneros são regularmente associados à silagem: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Estas bactérias podem ser divididas em homofermentativas, as quais produzem principalmente ácido láctico, ou heterofermentativas, onde produtos adicionais como etanol e ácido acético, assim como CO_2 são formados. A via homofermentativa é mais eficiente em termos de produção de ácido e perda de energia (PAHLOW et al., 2003).

Os ácidos produzidos reduzem o pH da forragem entre 4,0 e 5,0 para silagens de alfafa e capins, e abaixo de 4,0 em silagens de milho. Assim, com pH suficientemente baixo, os principais competidores de bactérias ácido lácticas em condições anaeróbias (enterobactérias, clostrídeos e bacilos) são inibidos (MUCK, 2010).

2.1.2.1 Espécies do gênero *Lactobacillus*

As espécies do gênero *Lactobacillus* têm se mostrado eficientes na produção de ácidos controladores de deterioração, e podem ser divididas em três grupos (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; HOLZER et al., 2003):

- GRUPO I: composto por BAL homofermentativas obrigatórias, as quais fermentam hexoses a ácido láctico (2 moles de láctico a partir de 1 mol de glicose), mas não fermentam pentoses por não possuírem a enzima fosfoquetolase. Ex.: *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. bovis*, etc.
- GRUPO II: representado pelas BAL heterofermentativas facultativas, estas bactérias utilizam a mesma rota do grupo I para hexoses e também fermentam pentoses, pois possuem tanto a enzima aldolase como a fosfoquetolase. Ex.: *L. plantarum*, *L. casei*, *L. sakei*, *L. curvatus*, etc
- GRUPO III: são as chamadas BAL heterofermentativas obrigatórias. Fermentam hexoses em outros produtos além do ácido láctico (1 mol de glicose resulta em 1mol de etanol ou acético e 1 mol de CO₂). Ex.: *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, etc.

A maior parte das bactérias ácido lácticas em silagens pertencem aos dois últimos grupos.

Lactobacillus plantarum foi uma das espécies pioneiras de estudo em silagens, por ser a espécie isolada com mais frequência e por apresentar as características consideradas ideais para um microrganismo na silagem, dentre elas: crescimento vigoroso e habilidade de competir e dominar outros microrganismos, possuir rota homofermentativa, no caso da fermentação de hexoses (principais açúcares em forragens), para produzir quantidades elevadas de ácido láctico a partir de açúcares (hexoses) prontamente disponíveis, ser ácido tolerante e capaz de produzir pH de pelo menos 4,0, de preferência o mais rápido possível para inibir a atividade de outros microrganismos, ser capaz de fermentar glicose, frutose, sucrose, frutanas, e preferencialmente açúcares de 5 carbonos (pentoses), não apresentar ação sobre ácidos orgânicos, possuir faixa de temperatura de crescimento até 50°C, e ser hábil em crescer em substratos com baixo teor de umidade (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

A bactéria heterofermentativa *Lactobacillus buchneri* foi descoberta a partir de estudos de exposição aeróbia em silagens de alfafa e milho, onde observou-se que

as silagens de alfafa apresentavam resistência natural à deterioração. A partir disso, pesquisadores isolaram uma cepa de *L. buchneri* de uma dessas silagens resistentes, e observaram que na ausência de O_2 , *L. buchneri* converte ácido láctico em ácido acético, responsável pela inibição de fungos e leveduras (COOKE, 1995). Não fermentam glicose anaerobicamente até etanol pois não possuem a enzima acetaldéido desidrogenase (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Lactobacillus buchneri tem maior afinidade para metabolizar ácido láctico em pH 3,8 do que em pH 4,3, e a habilidade em converter ácido láctico em acético e 1,2-propanodiol é expressa somente em pH inferior a 5,8 (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Na conversão de ácido láctico a acético pelo *L. buchneri*, um terço da matéria seca é perdido na forma de CO_2 (1 a 2% MS), entretanto a presença de ácido acético pode compensar as maiores perdas pela ação de microrganismos aeróbios após a abertura do silo (WEINBERG; MUCK, 1996). A fermentação heterolática é menos eficiente que a homolática especialmente se o açúcar predominante for a frutose, o que ocorre em capins de clima temperado (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

2.1.3 Bactérias do gênero *Clostridium*

Os clostrídeos são bactérias gram-positivas, esporulantes, normalmente móveis, estritamente anaeróbios, os quais fermentam açúcares, ácidos orgânicos ou proteínas.

Esses microrganismos desenvolvem-se em pequenos nichos criados por microrganismos aeróbios, como as leveduras e os bacilos, que usam o ácido láctico e os aminoácidos, reduzindo o oxigênio e aumentando o pH, tornando-o em ambiente ideal para o crescimento dos clostrídeos durante a fermentação. Sua presença na silagem é resultado da contaminação de solo, já que o número desses microrganismos nas plantas verdes é geralmente baixo. (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Depois do fechamento do silo, alguns clostrídeos se multiplicam quase que tão precocemente quanto outras bactérias que ocorrem nos primeiros dias. O fluido celular de plantas é um meio ideal para seu crescimento. O maior crescimento dos clostrídeos normalmente ocorre somente em estágio tardio de ensilagem e seus

produtos metabólicos tendem a aparecer em silagens mais velhas (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991),

O crescimento de clostrídeos é estimulado pela alta temperatura de estocagem ($>30^{\circ}\text{C}$), baixo teor de matéria seca ($<30\%$), baixo teor de carboidratos solúveis e alta capacidade de tamponamento. Se o pH baixo e estável não for atingido ($<4,6$), a atividade dos clostrídeos será encorajada (PITT et al., 1990).

Os clostrídeos podem se divididos em dois grandes grupos:

- 1) Clostrídeos sacarolíticos – *Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum* – fermentam principalmente glucose, frutose e ácidos orgânicos.
- 2) Clostrídeos proteolíticos – *Clostridium sporogenes* e *Clostridium bifermentans* – fermentam principalmente aminoácidos. (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991)

Existem ainda os que realizam os dois tipos de atividade, como *Clostridium perfringens*, que podem fermentar tanto açúcares como aminoácidos. Com a fermentação por clostrídeos podem ser observadas perdas de até 51,1% de MS e até 20,9% de energia (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Tanto a frutose como a glucose podem ser fermentadas pelos clostrídeos, contudo a eficiência de uso desses substratos é variável entre as espécies. Além disso, algumas espécies como o *Clostridium tyrobutyricum*, somente fermentam o lactato na presença do acetato. Açúcares e ácido láctico são utilizados pelos clostrídeos como fonte de energia por uma via similar, sendo o piruvato um intermediário, produzindo butirato, dióxido de carbono e hidrogênio. Os clostrídeos usualmente são considerados os únicos responsáveis pela produção do ácido butírico, mas outros organismos como as leveduras e os *Bacillus* spp., podem produzir pequena quantidade (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Embora as propriedades antifúngicas do ácido butírico possam aumentar a estabilidade da silagem à exposição aeróbia (ADESOGAN et al., 2004), seu odor, devido ao ácido butírico e aminas biogênicas, diminui o consumo voluntário efetuado pelos ruminantes.

Os clostrídeos proteolíticos podem seletivamente degradar muitos aminoácidos. Os aminoácidos oxidados são convertidos até ácidos graxos com um átomo de carbono a menos que sua composição original (embora ocorra redução de um aminoácido, a composição do ácido graxo é mantida). Uma reação típica é a fermentação da alanina e glicina para produção de ácido acético, amônia (NH_3) e

dióxido de carbono. Assim, a concentração de amônia na silagem pode ser utilizada como um indicador do grau de atividade proteolítica de clostrídeos (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

A espécie *Clostridium tyrobutyricum* é a espécie mais relevante para a indústria de laticínios, pois pode degradar o ácido láctico até ácido butírico, H₂O e CO₂. Esta fermentação ácido butírica é responsável por produção significativa de gás, causando o defeito denominado "estufamento tardio" em queijos duros e semiduros como emmental, gouda e parmesão além do odor rançoso e sabor característico (KLIJN et al., 1995).

2.1.4 Fungos

Os organismos do reino Fungi caracterizam-se por serem aclorofilados, eucarióticos e heterotróficos, não formando tecidos especializados e sistemas de órgãos como as plantas e animais superiores (GUARRO et al., 1999). Podem apresentar crescimento na forma de uma única célula simples, como as leveduras ou em colônias filamentosas multicelulares, por exemplo, os mofo, sendo muito abundantes no solo, vegetação e água.

O principal mecanismo para obtenção de nutrientes para seu desenvolvimento ocorre por meio da secreção de enzimas celulares, como as proteases, lipases, amilases e celulasas, que têm capacidade de quebra de complexos orgânicos, de baixa ou nenhuma absorção, em monômeros simples, que podem ser absorvidos por suas membranas celulares.

Rotz;Muck (1994) destacam ainda que as leveduras consomem apenas compostos solúveis, tais como açúcares e produtos da fermentação, enquanto que os fungos degradam uma ampla variedade de nutrientes, incluindo carboidratos estruturais e lignina.

2.1.4.1 Leveduras

A presença de leveduras foi identificada pela primeira vez em silagens no ano de 1932, mas sua importância foi ignorada até 1964, quando pesquisadores demonstraram que elas possuem importante papel na deterioração da silagem quando exposta ao ar. A maioria das leveduras encontradas em forragens colhidas

frescas são espécies não fermentativas do gênero *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Torulopsis*. As principais leveduras verificadas em silagens foram classificadas em dois grupos fisiológicos:

- 1) Crescimento interno: apresentando alta capacidade fermentativa de açúcares, limitada para lactato;
- 2) Crescimento externo: apresentando baixa capacidade fermentativa, mas alta capacidade de assimilação de lactato;

Algumas espécies associadas com o processo de ensilagem compreendem as espécies do gênero *Candida*, *Hansenulla*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Torulopsis* (JONSSON, 1989 apud McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991)

Diversos autores relataram que os valores de pH não são fortes fontes de inibição em relação ao crescimento e desenvolvimento das leveduras. Os valores de crescimento são muito variáveis, de 3 a 8, sendo algumas cepas capazes de tolerar pH inferior ou igual a 2 (WOOLFORD, 1990; McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; JOBIM; GONÇALVES, 2003). Porém, Woolford (1990), relata que os níveis ótimos de crescimento, para a maioria das espécies envolvidas neste processo, encontram-se na faixa de 3,5 a 6,5.

A inibição das leveduras pelos ácidos orgânicos de cadeia curta, como o acético, ocorre porque parte dos ácidos dissociados do sistema de transporte ativo estão envolvidos na formação de ATP. Moléculas não dissociadas passam para dentro das células por difusão passiva e sua dissociação libera íons H⁺. Isso reduz o pH intracelular para um nível que poderia rapidamente matar a célula, a menos que os íons sejam forçados a sair do citoplasma, por meio de transporte passivo, um processo que requer energia (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Em condições anaeróbias, esta energia é fornecida pela fermentação de açúcares e dessa forma, a presença adequada de açúcar é essencial para a sobrevivência das leveduras em ambientes anaeróbios ácidos. Isto poderia explicar porque um grande número de leveduras é encontrado em silagens contendo carboidratos solúveis. A presença de carboidratos solúveis pode também influenciar a assimilação de lactato em condições de baixas tensões de oxigênio, porque algumas leveduras como as *Saccharomyces cerevisiae*, possuem um sistema de transporte ativo de lactato e outros ácidos orgânicos.

As leveduras são capazes de produzir tanto lactato como acetato pela fermentação de açúcares, contudo, sua presença na silagem não é desejável. Isso

ocorre porque, primeiramente, elas são associadas com a deterioração aeróbia e, secundariamente, elas competem com bactérias produtoras de ácido láctico por substrato. Além disso, as leveduras podem fermentar etanol, que contribui pouco para a preservação da silagem. Outros produtos quando o etanol é formado anaerobicamente pelas leveduras, incluem n-propanol, isopentanol, ácidos acético, propiônico, butírico e isobutírico e pequenas quantidades de ácido láctico (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

2.1.4.2 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são pouco significativos para o processo fermentativo durante a ensilagem, mas contribuem grandemente para as perdas de superfície, durante o descarregamento da massa e nos casos de compactação e vedação inadequadas (JOBIM; GONÇALVES, 2003).

Quando na presença de oxigênio, metabolizam os açúcares residuais ou ácidos orgânicos formados, acarretando em elevação nos valores de pH. Podem degradar também proteínas com formação de NH_3 , o qual tem ação tamponante, neutralizando os ácidos formados e impedindo o abaixamento do pH. (PAHLOW et al., 2003)

Embora vários mofos produzam micotoxinas, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são as causas mais frequentes de redução do valor nutricional e toxicidade (BRUERTON, 2001).

Alguns autores relatam que o padrão de crescimento dos fungos é semelhante ao das leveduras, sendo frequentemente refletido no aparecimento de dois picos de elevação da temperatura durante a deterioração. O primeiro pico, geralmente atribuído à ação de leveduras e bactérias ácido acéticas, pode ocorrer dentro de dois e três dias de exposição ao ar. Já o segundo, ocorre de três a quatro dias após o primeiro, sendo atribuído a fungos filamentosos (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; MERRY; DAVIES, 1999).

2.2 Aditivos para silagem

O processo de ensilagem controla a atividade de microrganismos na forragem pela combinação de ambiente anaeróbio e fermentação de açúcares por bactérias

ácido lácticas. Uma vez gerado o ambiente anaeróbio, a população de bactérias ácido lácticas cresce rapidamente, e se torna, na maioria dos casos, o microrganismo dominante na forragem (MUCK, 2010).

Segundo Kung et al. (2003), algumas razões para a utilização de aditivos no processo de ensilagem compreendem: a inibição do crescimento de organismos aeróbios, especialmente aqueles associados com deterioração aeróbia, como por exemplo, leveduras assimiladoras de lactato e *Listeria monocytogenes*; retardar o crescimento de microrganismos anaeróbios indesejáveis, como enterobactérias e clostrídeos; suprimir a atividade das enzimas proteases e deaminases, tanto das plantas como microbiana; melhorar o suprimento de substratos fermentescíveis para as bactérias ácido lácticas, adicionar microrganismos benéficos para dominar a fermentação; fornecer ou liberar nutrientes para estimular o crescimento de microrganismos benéficos; melhorar a recuperação de nutrientes e MS, entre outros.

Atualmente, existe grande diversidade de aditivos, químicos e microbianos, disponíveis para auxiliar o processo fermentativo, sendo que os últimos vêm ganhando destaque recentemente.

2.2.1 Inoculantes bacterianos

Inoculantes bacterianos apresentam algumas vantagens em relação aos aditivos químicos, uma vez que são seguros, de fácil manipulação, não poluentes, não corrosivos ao maquinário e são considerados produtos naturais.

Estes aditivos contêm bactérias ácido lácticas suplementares à população epífita da forragem, que auxiliam no rápido estabelecimento da fermentação. No início, os inoculantes bacterianos comercializados eram compostos por uma ou mais cepas de bactérias ácido lácticas homofermentativas, sendo o *Lactobacillus plantarum* a mais comum. Atualmente, uma espécie heterofermentativa, o *Lactobacillus buchneri* vem ganhando destaque por seus efeitos na estabilidade aeróbia de silagens (WEINBERG; MUCK, 1996).

Embora a fermentação heteroláctica seja menos eficiente quando comparada à homoláctica, a melhor estabilidade aeróbia da massa ensilada representa grande vantagem na utilização de aditivos contendo cepas de BAL heteroláticas (KUNG; RANJIT, 2001; NISHINO et al., 2004; MENDES et al., 2008; KRISTENSEN et al., 2010; TABACCO et al., 2011; ÁVILA et al., 2012).

Atualmente, combinações de bactérias homoláticas e heteroláticas têm sido avaliadas em diversas forragens (silagens de milho, trigo, alfafa e capins) com o intuito de conciliar o efeito positivo da homoláticas na fermentação, com rápido abaixamento do pH pela elevada produção de ácido lático e as vantagens das bactérias heteroláticas no pós abertura, pela produção de ácido acético, eficiente no controle de fungos e leveduras (FILYA, 2003; HU et al., 2009; REICH; KUNG, 2010; ARRIOLA et al., 2011; QUEIROZ et al., 2012)

A dose de bactérias ácido lácticas também tem sido objetivo de diversos estudos, a fim de se obter a melhor relação custo:benefício na produção de silagem. Segundo O'Kiely;Muck (1998), inoculações de bactérias homoláticas na dose de 10^5 e 10^6 bactérias por grama de forragem, são eficientes em promover uma rápida e eficiente fermentação melhorando a recuperação da MS (2-3%) e queda mais rápida do pH.

Em um estudo conduzido por Filya;Sucu;Karabulut (2006), estudando os efeitos de diferentes doses de *L. buchneri* (1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 ufc/g) em silagens de milho, observaram que as três doses foram eficientes em incrementar a estabilidade aeróbia das silagens pelo aumento na concentração de ácido acético e redução do número de leveduras. Sob condições aeróbias as concentrações de 5×10^5 e 1×10^6 ufc/g apresentaram menores valores de pH, produção de CO_2 , e número reduzido de leveduras.

Kung;Ranjit (2001) sugerem que para silagens de milho e de cevada a alta taxa de inoculação deve ser utilizada para obtenção de efeitos consistentes. Taylor; Kung Jr. (2002), mostram maior efetividade quando a concentração de *L. buchneri* é superior a 5×10^5 ufc/g e armazenamento por período superior a 45 dias.

2.3 Tempo de armazenamento

Embora o pH da silagem reduza rapidamente e estabilize por volta de três a sete dias após a colheita (BOLSEN et al., 1992; STOKES, 1994), um período de 21 a 30 dias tem sido difundido como tempo adequado para a fermentação. Entretanto, alterações nos produtos finais de fermentação, mesmo após vários meses de ensilagem sugerem que a atividade microbiana persiste mesmo quando o pH é baixo. A fermentação prossegue além dos sete dias, com aumentos significativos de ácido lático, etanol e nitrogênio amoniacal (N-NH_3) entre sete e 120 dias após a colheita (BOLSEN et al., 1992). Ward; Ondarza (2008) verificaram necessidade de

pelo menos 120 dias para a completa fermentação. Durante a fase de estabilidade atingida nas silagens, muitos microrganismos ainda estão em estado dormente, porém ainda viáveis (KUNG; BEDROSIAN, 2010). *Lactobacillus buchneri* parece ser bastante ativo durante um longo período de armazenamento de silagem de milho. Sob condições anaeróbias e pH baixo, este organismo é capaz de converter ácido láctico até ácido acético, etanol e 1,2 propanodiol (OUDE-ELFERINK et al., 2001).

O processo de ensilar a planta inteira do milho proporciona alterações nos teores de carboidratos presentes na planta. HALLADA et al. (2008) verificaram aumento constante na digestibilidade *in situ* da fibra em detergente neutro (D-FDN) em silagens de milho, elevando-se 1,2 unidades percentuais ao mês entre o dia 1 e 330 de armazenamento, atingindo um platô após 180 dias. No entanto, CONE et al. (2008), constataram que 180 dias de armazenamento da silagem não afetou a digestibilidade da porção fibra *in vitro*. Dados de Der Bedrosian; Kung; Nestor (2010) para 45 e 315 dias de armazenamento também não afetaram a digestibilidade *in vitro* da FDN.

Referências

- ADESOGAN, A.T.; KRUEGER, N.A.; SALAWU, M.B.; DEAN, D.B.; STAPLES, C.R. The influence of treatment with dual purpose inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of bermudagrass. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, p.3407-3416, 2004.
- ARRIOLA, K.G.; KIM, S.C.; ADESOGAN, A. T. Effect of applying inoculants with heterolactic or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation and quality of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 1511-1516, 2011.
- ÁVILA, C.L.S.; PINTO, J.C.; OLIVEIRA, D.P.; SCHWAN, R.F. Aerobic stability of sugar cane silages with a novel strain of *Lactobacillus* sp. isolated from sugar cane. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 2, p. 249-255, 2012.
- BOLSEN, K.K.; LIN, C.; BRENT, B.E.; FEYERHERM, A.M.; URBAN, J.E.; AIMUTIS, W.R. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, p. 3066-3083, 1992.
- BRUERTON, K. Finding practical solutions to mycotoxins in commercial production: a nutritionist's perspective. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 17., 2001, Sorrento, **Proceedings...** Sorrento, Australia 2001. p. 161-168.

CONE, J. W.; VAN GELDER, A. H.; VAN SCHOTEN, H. A.; GROTEN, J. A. M. Effects of chop length and ensiling period of forage maize on in vitro rumen fermentation characteristics. Netherlands, **Journal of Agricultural Science**. Cambridge. v. 55. p. 155-166, 2008.

COOKE, L. New strains slows silage spoilage. **Agricultural Research**, 1995, <http://www.ars.usda.gov/is/ar/archive/jun95/spoilage0695.htm?pf=1>. Acessado em 31/06/2012.

DER BEDROSIAN, M. C.; KUNG, Jr.; NESTOR, K. E. Jr. The effects of length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93 (Suppl. 1):176. Abstr, 2010.

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

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

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 454-500, 1999.

HALLADA, C. M.; SAPIENZA, D. A.; TAYSOM, D. Effect of length of time ensiled on dry matter, starch and fiber digestibility in whole plant corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, 91(E-Suppl.):30. Abstr, 2008.

HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; DANNER, H.; BRAUN, R. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, p. 282-287, 2003.

HU, W.; SCHMIDT, R.J.; McDONELL, E.E.; KLINGERMAN, C.M.; KUNG JR., L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, p. 3907-3914, 2009.

JOBIM, C.C.; GONÇALVES, G.D. Microbiologia de forragens conservadas. In: RIS, R.A.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R.; MOREIRA, A.L. **Volumosos na produção de ruminantes: valor alimentício de forragens**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. p. 51-70.

KLIJN, N.; NIEUWENHOF, F.F.; HOOLWERF, J.D.; VAN DER WALLS, C.B.; WEERKAMP, A.H. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species: specific PCR amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 8, p. 2919-2924, 1995.

KUNG, Jr. DER BEDROSIAN, M, C. Effect of time of storage on changes in nutrient composition and value of silages. Department of Animal and Food Sciences

University of Delaware. **Proceedings...** Penn State Dairy Cattle Nutrition Workshop, 2010.

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

KUNG JR., L.; TAYLOR, C. C.; LYNCH, M. P.; Neylon, J. M. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n.11, p. 336-343, 2003.

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

LIN, C.; BOLSEN K.K.; BRENT, B.E.; HART, R.A.; DICKERSON, J.T.; FEYERHERM, A.M.; AIMUTIS, W.R. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, p. 2484-2493, 1992.

McDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. **The biochemistry of silage**. Manchester: John Wiley & Sons, 1991. p. 81- 151.

MENDES, C.Q.; SUSIN, I.; NUSSIO, L.G.; PIRES, A.V.; RODRIGUES, G.H.; URANO, F.S. Efeito do *Lactobacillus buchneri* na fermentação, estabilidade aeróbia e no valor nutritivo de silagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 12, p. 2191-2198, 2008.

MERRY, R.J.; DAVIES, D.R. Propionibacteria and their role in the biological control of aerobic spoilage in silage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, p. 149-164, 1999.

MUCK, R.E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p.183-191, 2010. Suplemento.

NISHINO, N.; WADA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H. Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 2563–2570, 2004.

O'KIELY, P.; MUCK, R.E. Grass silage. In: CHERNEY, J.H.; CHERNEY, D.J.R. (Ed.). **Grass for dairy cattle**. Wallingford: Oxford: CAB International, 1998. chap. 9, p. 223-251.

OUDE ELFERINK, S.J.H.W.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.C.; SPOELSTRA, S.F.; FABER, F.; DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 125-132, 2001.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.H.W.; SPOELSTRA S.F.; Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 31-93.

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

QUEIROZ, O.C.M.; ADESOGAN, A.T.; ARRIOLA, K.G.; QUEIROZ, M.F.S. 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, p. 3354–3362, 2012.

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

ROTZ, C.A.; MUCK, R.E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: FAHEY JUNIOR, G.C. (Ed.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 1994. p. 828-868.

STOCK, R.A.; SINDT, M.H.; CLEALE, R.; BRITTON, R.A. High-moisture corn utilization in finishing cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69: p. 1645-1656, 1991.

TABACCO, E.; PIANO, S.; REVELLO-CHION, A.; BORREANI, G. 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, p. 5589-5598, 2011.

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

WARD, R. T.; ONDARZA, M. B. Effect of month of sample submittal on corn silage nutrient fractions, starch availability, NDF digestibility, and fermentation profiles measured at a commercial forage-testing laboratory. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 91(E. Suppl. 1):30. Abstr, 2008

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

WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. 305 p.

_____. The detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, p. 101–116, 1990.

3 DETERIORAÇÃO AERÓBIA EM SILAGENS DE MILHO SOB DOSES CRESCENTES DE *Lactobacillus buchneri* EM DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO

Resumo

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito de doses crescentes de *L. buchneri*, e diferentes tempos de armazenamento sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e valor nutritivo de silagens de milho. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com medidas repetidas no tempo, com cinco tratamentos, quatro períodos de estocagem e quatro repetições, totalizando assim, 80 unidades experimentais. Os tratamentos testados foram: Controle – silagem de milho sem adição de inoculante; 1×10^5 ; 3×10^5 ; 5×10^5 ; e 1×10^6 ufc/g forragem fresca de *Lactobacillus buchneri*. As concentrações de MS, MM e EE das silagens não foram alteradas pelo tratamento, e sofreram apenas influência do tempo de armazenamento. Os teores de PB foram maiores nas silagens com maiores concentrações de *L. buchneri*. O tempo de armazenamento aumentou os teores de PB, lignina e DVIVMS. Os teores de celulose, hemicelulose, FDN e FDA diminuíram com o tempo de armazenamento. As concentrações de amido foram maiores para as aberturas 90 e 150 dias, seguido pela abertura 60 dias e 15 dias. Os teores de NFDA decresceram com o aumento das doses de aditivo utilizado e aumento do tempo de armazenamento. O tratamento com *L. buchneri* não afetou a contagem de fungos, com decréscimo nas contagens com maiores tempos de armazenamento. Os teores de ácido láctico diminuíram com o aumento da dose de *L. buchneri*. As variáveis BAL, leveduras, pH, ácido butírico e ácido acético foram influenciadas tanto pelo tratamento como pelo tempo de estocagem. Os maiores períodos de armazenamento resultaram em decréscimo na contagem de BAL, e maiores valores de pH. O tempo de armazenamento foi responsável pela diminuição das leveduras na silagem de milho. Para as variáveis perda de MS, perdas por gases e temperatura máxima, não houve efeito de tratamento, apenas pelo efeito do tempo de armazenamento, diminuindo ao longo do tempo. Observou-se aumento na produção de efluentes com maior tempo de armazenamento. As variáveis Tempo Max, Perda de estabilidade, AC5 e AC10 foram influenciadas pelo tratamento e tempo de armazenamento. Maiores tempos de armazenamento propiciaram maiores tempos para atingir a temperatura máxima e a perda de estabilidade aeróbia. As silagens com doses superiores de *L. buchneri* apresentaram perda de estabilidade em momento posterior às silagens dos tratamentos controle e LB 1×10^5 . O maior tempo de armazenamento da silagem de milho resultou em maior valor nutritivo e perfil microbiológico favorável quanto à fermentação e estabilidade em aerobiose. Inoculação com *Lactobacillus buchneri* (NCIMB 40788) reduz a sobrevivência de leveduras durante a fase de armazenamento e o crescimento durante a exposição ao oxigênio, melhorando a estabilidade aeróbia da silagem em ambiente tropical. O aditivo foi efetivo em manter a estabilidade aeróbia nas silagens após 90 dias de armazenamento com doses superiores a 5×10^5 ufc/g forragem. Doses mais elevadas poderiam compensar parcialmente o menor tempo de armazenamento das silagens.

Palavras-chave: Levedura; inoculante; perdas; estabilidade aeróbia

Abstract

The objective of this trial was to evaluate the effect of increasing *L. buchneri* doses, and different storage periods on the fermentation profile, aerobic stability and nutritive value of corn silage. The experiment was carried out in a completely randomized design, with repeated measurements over time, with five treatments, four storage periods and four replications, totalizing 80 experimental units. Tested treatments were: Control – corn silage with no additive; 1×10^5 ; 3×10^5 ; 5×10^5 ; and 1×10^6 cfu/g fresh forage of *Lactobacillus buchneri*. The silages DM, ash and EE contents did not differ among treatments, but differ along storage period. Crude protein contents were higher at the higher *L. buchneri* dose silages. Storage period increased the CP, lignin and IVTDMD content. Cellulose, hemicellulose, NDF and ADF contents decreased along storage period. Starch content was higher for the 90-d and 150-d opening, followed by the 60-d and 15-d. The ADF-N content decreased with increased *L. buchneri* doses and storage period. Silages inoculation with *L. buchneri* did not affect the fungi counts, with decreased counts with higher storage periods. Lactic acid content was influenced only by treatment, with decrease in concentrations as the *L. buchneri* dose increased. Lactic acid bacteria, yeasts, pH, butyric and acetic acid were influenced by both treatment and storage period. Larger storage periods resulted in decreased LAB counts and higher pH values. Storage time decreased yeast count in corn silage. For the dry matter losses, gas losses and maximum temperature there was no treatment effect, only storage period effect, decreasing along time. It was observed an increase in effluent production with higher storage time. Time to reach maximum temperature, AC5 and AC10 were influenced by both treatment and storage period. Higher storage periods resulted in higher time to reach the maximum temperature and to reach the aerobic stability. Silages with the higher *L. buchneri* doses showed aerobic stability threshold after control and LB 1×10^5 silages. The higher storage period of corn silages resulted in higher nutritive value and microbial profile favorable to the fermentation and stability during aerobic exposure. Inoculation with *Lactobacillus buchneri* (NCIMB 40788) reduces the survival of yeasts during the storage phase, and its growth during oxygen exposure, improving silage aerobic stability in tropical regions. The inoculants were effective in maintaining the aerobic stability in silages after 90 days storage, in doses higher than 5×10^5 cfu/g fresh forage. Higher doses might partly compensate the lower storage time in silages.

Keywords: Yeast; inoculant; losses; aerobic stability

3.1 Introdução

Os princípios fundamentais da inoculação microbiana em silagens são: dominar a flora epífita, rápido abaixamento do pH pela produção acentuada de ácido láctico, redução de produtos indesejáveis e, conseqüentemente, a melhor conservação dos nutrientes da forragem. Entre as principais vantagens da utilização de aditivos biológicos tem-se a facilidade de utilização, a segurança proporcionada pelas cepas (não patogênicas e não poluidoras ambientais) e a ação não corrosiva nos equipamentos (FILYA et al., 2003).

Historicamente, as bactérias ácido lácticas homofermentativas foram as primeiras a serem consideradas como aditivos nas silagens, já que no passado se dava maior importância à fermentação em si do que à estabilidade aeróbia (WEINBERG; MUCK, 1996; KUNG, 2009).

Uma forma de amenizar as perdas no processo fermentativo e na estabilidade aeróbia é a utilização de inoculantes microbianos à base de bactérias heteroláticas que vêm apresentando capacidade de reduzir a população de leveduras de silagens de milho e de gramíneas de clima temperado (RANJIT; KUNG, 2000; TAYLOR; KUNG, 2002). Segundo Oude Elferink et al. (2001), o *Lactobacillus buchneri* melhora a estabilidade aeróbia por meio da conversão do ácido láctico em ácido acético e ácido propiônico, os quais são efetivos no controle de fungos e leveduras, sob baixo pH.

Aditivos contendo cepas de *L. buchneri*, BAL heterofermentativa, têm sido considerados por muitos pesquisadores como ideais, uma vez que produzem elevada concentração de ácido acético, promovendo desta forma melhor estabilidade aeróbia da massa ensilada.

Filya et al. (2006), estudando o efeito do *L. buchneri* na fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de milho constataram maior deterioração aeróbia quando cepas de bactérias homofermentativas foram adicionadas à massa ensilada. Estes mesmos autores propõem duas razões para este fato, primeiramente sob condições anaeróbias, as BAL homofermentativas produzem principalmente ácido láctico. Este ácido é utilizado como substrato, em aerobiose, por leveduras assimiladoras de ácido láctico, e além disso, não é um eficiente agente antimicótico quando comparado ao ácido acético (WEINBERG; MUCK, 1996).

Kung;Ranjit (2001) relataram que embora a fermentação heterolática seja menos eficiente quando comparada à homolática, a melhora na estabilidade aeróbia

proporcionada durante o período de armazenamento e de fornecimento aos animais, e as menores perdas de MS são importantes vantagens da utilização de aditivos contendo cepas de BAL heteroláticas.

Em um estudo conduzido por Filya et al. (2006), avaliando os efeitos de doses de *L. buchneri* (1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 ufc/g) em silagens de milho, os autores observaram que as três doses foram eficientes em incrementar a estabilidade aeróbia das silagens pelo aumento na concentração de ácido acético e redução do número de leveduras. Sob condições aeróbias as concentrações de 5×10^5 e 1×10^6 ufc/g apresentaram menores valores de pH, reduzida produção de CO_2 e decréscimo no número de leveduras.

Taylor;Kung (2002), mostraram maior efetividade quando a concentração de *L. buchneri* é superior a 5×10^5 ufc/g e o armazenamento ocorre por período superior a 45 dias.

Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi reavaliar o efeito de doses crescentes de *L. buchneri*, e diferentes tempos de armazenamento sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e valor nutritivo de silagens de milho em ambiente tropical.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Ensilagem e tratamentos

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ). O híbrido de milho utilizado foi o Pioneer 30F90 *Bt* e quando o mesmo atingiu média de 33% de matéria seca, 120 dias após sua emergência, procedeu-se a ensilagem (Tabela 1), no dia 25/03/2009. As plantas foram colhidas mecanicamente com colhedora de forragem marca Mentamint[®], tracionada por trator, regulada para picagem com tamanho médio de partículas entre 5 a 10 mm.

Como silos experimentais (unidades experimentais) foram utilizados baldes plásticos com capacidade de 20L com tampas próprias à vedação e adaptadas com válvulas do tipo Bunsen, para que fosse possível o escape de gases e a avaliação das perdas gasosas durante a ensilagem. Durante a ensilagem, os silos foram abastecidos em camadas de 10-15 cm e compactados por pisoteio humano até atingir densidade média estimada de 600 kg/m^3 . No fundo de cada balde foram colocados dois quilos de areia seca, separados da massa de forragem por tela fina

de plástico e duas camadas de tecido fino de algodão, com vista à avaliação quantitativa de efluentes. Após o enchimento, os silos foram fechados com as tampas apropriadas, identificados e pesados. Após a pesagem as tampas foram vedadas com fita plástica auto-adesiva, para impedimento da entrada de ar e os silos experimentais foram mantidos em local protegido, sob temperatura ambiente, até o momento da abertura (JOBIM et al., 2007).

O inoculante era composto por bactérias da espécie *Lactobacillus buchneri* (NCIMB 40788) na concentração de 30×10^9 ufc/g produzido pela empresa Lallemand®. O inoculante foi diluído em água destilada e pulverizado sobre a massa. Em todos os tratamentos foi respeitada a adição de água destilada com uma concentração de 4 litros por tonelada de forragem fresca. Foram utilizadas cinco concentrações do inoculante:

Controle – Silagem de milho sem adição de inoculante;

1×10^5 – Adição de 100.000 ufc/g forragem fresca de *Lactobacillus buchneri*;

3×10^5 – Adição de 300.000 ufc/g forragem fresca de *Lactobacillus buchneri*;

5×10^5 – Adição de 500.000 ufc/g forragem fresca de *Lactobacillus buchneri*;

1×10^6 – Adição de 1.000.000 ufc/g forragem fresca de *Lactobacillus buchneri*.

3.2.2 Abertura dos silos experimentais

Foram realizadas quatro aberturas, avaliando assim a influência do tempo de estocagem sobre a qualidade da forragem, ocorrendo aos 15, 60, 90 e 150 dias após a ensilagem. Decorrido o tempo estabelecido, cada grupo de silos foi submetido às avaliações previstas. Primeiramente os silos foram limpos e pesados para determinação de perdas durante o armazenamento. Após a pesagem, amostras foram retiradas do centro do silo para determinação do perfil fermentativo, contagem de microrganismos e valor nutritivo das silagens. Após a fase de pesagem e amostragens deu-se início à montagem do ensaio de estabilidade aeróbia. A seguir é apresentada descrição detalhada dessas avaliações.

3.2.3 Amostragens e variáveis analisadas na forragem fresca

Durante a ensilagem, a forragem foi amostrada e dividida em três sub-amostras. A primeira sub-amostra foi pesada e seca em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas (AOAC, 1990). Após este período as amostras foram pesadas novamente, moídas em moinhos tipo Wiley com peneira de malha 1mm e

armazenadas em potes de plástico. Com as amostras secas e moídas foi determinado o teor de matéria seca (MS) em estufa a 105°C durante 12 horas. O conteúdo de matéria mineral (MM) foi determinado após incineração das amostras em forno tipo mufla a 550°C, durante três horas (AOAC, 1990).

A determinação da composição bromatológica da forragem foi realizada utilizando-se o método de espectroscopia de reflectância de infravermelho proximal (NIRS) (BERZAGHI; COZZI; ANDRIGHETTO, 1997; COZZOLINO; ACOSTA; GARCIA, 2001). O material moído foi escaneado para obtenção dos espectros. O equipamento utilizado foi o espectrômetro modelo NIRS 5000 (NIRSystems®, Silver Spring, MD, USA) acoplado a um microcomputador equipado com *software* WinISI II versão 6.2 (Intrasoft International, PA). As amostras foram escaneadas nesse equipamento obtendo leituras compreendidas entre os comprimentos de onda de 700 a 2100 nm. As amostras escaneadas geraram as seguintes variáveis: fibra insolúvel em detergente ácido (FDA); fibra insolúvel em detergente neutro (FDN); nitrogênio insolúvel em fibra detergente ácido (N-FDA); proteína bruta (PB); digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS); digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica (DVIVMO); extrato etéreo (EE); celulose; hemicelulose; lignina e amido.

A segunda sub-amostra foi utilizada nas avaliações microbiológicas, onde amostras de 25 g foram pesadas em sacos plásticos juntamente com 225 mL de solução salina (2,25g NaCl, 0,105g de KCl, 0,9g de CaCl₂ dihidratado e 0,05g de NaHCO₃) e homogeneizada durante quatro minutos em velocidade de 150 rpm por meio do equipamento Lab-Blender Stomacher 400 (Steward Laboratory, London). A partir dos extratos diluídos e filtrados em gase foram realizadas as demais diluições (10^{-2} a 10^{-6}) e o plaqueamento das diluições em placas com meio seletivo (Petrifilm 3M® AC e YM). Após o plaqueamento os filmes foram armazenados em incubadora (BOD) com temperatura controlada, sendo que os filmes para crescimento de bactérias ácido lácticas foram incubados por 48 horas a 32°C e os filmes para crescimento de leveduras e fungos foram incubados por 72 e 120 horas, respectivamente, a 23°C. As contagens de microrganismos presentes foram expressas como unidades formadoras de colônias e convertidos em logaritmo na base 10.

As placas Petrifilm® se constituem em cartões de papel quadriculados revestidos de polietileno recoberto com nutrientes desidratados e gel hidrossolúvel a

frio, protegidos por um filme plástico recoberto internamente pelo mesmo gel e corante indicador de trifeniltetrazólio (TCC) nas placas para crescimento de bactérias. Ao adicionar um mililitro da amostra, os nutrientes se hidratam e o gel se solidifica. Com o auxílio de um difusor específico, delimita-se a área de solidificação em 20cm² para placas de bactérias e 30cm² nas placas de leveduras e fungos. Após a solidificação de um minuto as placas estão prontas para serem incubadas. As bactérias reduzem o TCC por meio de enzimas, formando o composto denominado formazan que fica acumulado no interior das células e se torna vermelho, facilitando assim as contagens (SANT'ANA; AZEREDO, 2005).

Utilizou-se placas Petrifilm[®] visando facilitar a condução das análises e diminuir as contaminações em placas convencionais, devido às dificuldades no preparo de meio de cultivo e maior exposição ao ambiente quando foram utilizados protocolos convencionais. A metodologia para contagem de bactérias e leveduras utilizando Petrifilm[®] não apresenta diferenças em relação à metodologia tradicional em placas e meio de cultivo líquido (KNIGHT et al., 1997; BEUCHAT et al., 1998, DE SOUSA et al., 2005; SANT'ANA; AZEREDO, 2005).

3.2.4 Perdas de matéria seca durante o armazenamento

No momento da abertura, os baldes foram pesados objetivando-se avaliar o efeito dos tratamentos quanto às perdas de matéria seca total, produção de gases e produção de efluente. Para que fosse possível a determinação das perdas, o conjunto vazio (balde + areia + tampa + tela + pano) foi pesado antes da ensilagem e, imediatamente, após a abertura. Seguindo o mesmo procedimento, esse mesmo conjunto, quando contendo a forragem, também foi pesado nesses mesmos dois momentos (JOBIM et al., 2007).

A produção de efluentes foi calculada pela diferença entre o peso do conjunto sem forragem após a abertura e antes da ensilagem, em relação à quantidade de forragem ensilada, expressa em kg/t de MV:

$$PE = \frac{(P_{ab} - P_{en}) \times 1000}{(MV_{en})} \quad (1)$$

Onde:

PE = produção de efluente (kg/t de MV);

P_{ab} = peso do conjunto vazio (balde+areia+tampa+pano) no momento da abertura (kg);

P_{en} = peso do conjunto vazio (balde+areia+tampa+pano) no momento da ensilagem (kg);

MV_{en} = quantidade de massa verde inicialmente ensilada (kg);

As perdas gasosas foram calculadas pela diferença de pesos dos silos na ensilagem e na abertura, em relação à massa de forragem armazenada. Para esses cálculos foram descontadas as taras dos silos, e os valores expressos em % da MS (SCHMIDT, 2006):

$$PG = \frac{[(PC_{en} - P_{en}) \times MS_{en}] - [(PC_{ab} - P_{en}) \times MS_{ab}] \times 100}{[(PC_{en} - P_{en}) \times MS_{en}]} \quad (2)$$

Onde:

PG = perda por gases (% da MS);

PC_{en} = peso do balde cheio no momento da ensilagem (kg);

P_{en} = peso do conjunto vazio (balde+areia+tampa+pano) no momento da ensilagem (kg);

MS_{en} = teor de matéria seca da forragem na ensilagem (%);

PC_{ab} = peso do balde cheio no momento da abertura (kg);

MS_{ab} = teor de matéria seca da forragem na abertura (%);

A perda total de matéria seca foi calculada pela diferença entre o peso de matéria seca no momento da ensilagem e peso de matéria seca no momento da abertura, em relação à quantidade de matéria seca ensilada (Equação 3). Com base na equação descrita por Schmidt (2006) foram estimadas as perdas totais de matéria seca, expressas em %:

$$PMS = \frac{[(PC_{en} - P_{en}) \times MS_{en}] - [(PC_{ab} - P_{ab}) \times MS_{ab}] \times 100}{[(PC_{en} - P_{en}) \times MS_{en}]} \quad (3)$$

Onde:

PMS = perda total de matéria seca (%);

PC_{en} = peso do balde cheio no momento da ensilagem (kg);

Pen = peso do conjunto vazio (balde+areia+pano+tela) no momento da ensilagem (kg);

MSen = teor de matéria seca da forragem na ensilagem (%);

PCab = peso do balde cheio na abertura (kg);

Pab = peso do conjunto vazio (balde+areia+pano+tela) no momento da abertura (kg);

MSab = teor de matéria seca da forragem na abertura (%);

3.2.5 Amostragens e variáveis analisadas na silagem

Durante a abertura dos silos a silagem foi coletada e dividida em quatro amostras. A primeira sub-amostra foi utilizada para preparo do extrato aquoso, onde uma alíquota de 25 g de amostra foi pesada em saco plástico e diluída em 225 mL de água deionizada, seguida de homogeneização durante quatro minutos com velocidade de 150 rpm por meio do equipamento Lab-Blender Stomacher 400 (Steward Laboratory, London). Os extratos foram armazenados em tubos tipo eppendorf em freezer (-20°C) para futuras análises de ácidos graxos voláteis e ácido láctico.

Para análise dos ácidos graxos voláteis (ácido acético e ácido butírico), 800 µL do extrato aquoso da silagem, juntamente com 200 µL de ácido fórmico e 100 µL de padrão interno foram transferidos para um frasco de vidro. A leitura foi realizada em cromatógrafo líquido gasoso, CLG (Hewlett Packard® 5890, series II). A determinação da concentração de ácido láctico foi realizada por meio da adaptação do método espectrofotométrico (565 nm) de Pryce (1969). A adequação da curva padrão, 10 vezes maior do que a sugerida, foi necessária devido à elevada concentração de ácido láctico proveniente de silagem frente ao tipo de amostra utilizada na metodologia (plasma sanguíneo e urina).

A demais sub-amostras foram utilizadas para as análises já descritas no item 3.2.3.

3.2.6 Características da forragem no momento da ensilagem

Na Tabela 1 estão apresentados os dados referentes à forragem no momento da ensilagem, apenas para caracterização da forragem utilizada, sem comparações estatísticas.

Os teores de MS e MM apresentaram variação de 32,6 a 33,83%, e 4,66 a 5,02%, respectivamente. Os teores médios de FDN e FDA foram 55,37 e 35,11%, respectivamente.

No momento da ensilagem foi verificada a presença de leveduras, as quais apresentaram contagem média de 7,25 ufc/g. Nas forragens tratadas foi verificado aumento nas contagens de bactérias ácido lácticas de 8,52 até 9,31 ufc/g. No momento da ensilagem não foram detectados fungos filamentos nas amostras, provavelmente devido às diluições utilizadas.

Tabela 1 - Características da forragem no momento da ensilagem

Variável ¹	Tratamentos				
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶
MS, %	33,46	32,60	33,83	32,37	33,64
MM, % MS	4,86	4,66	4,60	5,02	4,70
PB, % MS	5,94	6,76	5,97	6,00	6,41
EE, % MS	1,85	2,52	1,83	1,84	1,91
FDN, % MS	55,96	53,43	55,12	56,79	55,58
FDA, % MS	35,77	32,05	35,55	36,50	35,69
Celulose, % MS	28,94	27,15	28,70	29,48	28,75
Hemicelulose, % MS	23,77	24,63	23,02	23,72	23,46
Lignina, % MS	5,59	4,77	5,81	5,55	5,60
Amido, % MS	18,72	19,36	19,73	18,25	18,98
N-FDA, % N total	8,42	7,30	8,42	8,46	7,95
DVIVMS, %	72,50	73,79	72,65	72,16	72,12
DVIVMO, %	71,62	72,61	71,82	71,33	71,14
BAL, log ufc/g	8,20	8,52	9,09	8,61	9,31
LEV, log ufc/g	7,28	7,30	7,19	7,41	7,06

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; N-FDA: nitrogênio insolúvel em FDA; PB: proteína bruta; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; DVIVMO: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica; EE: extrato etéreo; BAL: bactéria ácido láctica; LEV: levedura

3.2.7 Estabilidade aeróbia das silagens

Após a abertura dos silos, aproximadamente 4 kg de silagem foram acomodados sem compactação em baldes de plástico sem tampa com capacidade de 20 litros cada, os quais foram mantidos em ambiente protegido, com temperatura

controlada ($23^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) por um período de 240 horas (10 dias). Para cada silo experimental foram montados dois silos para o ensaio de estabilidade aeróbia. No primeiro balde foi acondicionado, no centro geométrico, sensor de temperatura associado a um sistema informatizado e eletrônico de aquisição de dados (Chiplog®, IMPAC, USA) programado para leitura da temperatura da massa em intervalos constantes de 15 minutos. No segundo balde foram realizadas as coletas de silagem para determinação de pH, microbiologia e MS em tempos pré-determinados.

Na abertura com tempo de estocagem de 15 dias as amostras foram coletadas com seis, 16, 28, 40, 52, 64, 76, 88, 100, 112, 124 e 240 horas para determinação de pH. Na abertura de 60 dias as amostras foram coletadas para determinação de pH com 48, 96, 120, 144, 192 e 240 horas após a abertura. Aos 90 dias de estocagem nos tempos 24, 48, 72, 96, 120 e 240 horas de exposição aeróbia as amostras foram coletadas para determinação de pH. Ao final de 150 dias de estocagem as amostras foram coletadas com 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 horas de exposição aeróbia para determinação de pH e com 48, 96, 120, 168 e 240 horas foram coletadas amostras para determinação de bactérias ácido lácticas, leveduras e fungos.

Para a determinação da estabilidade aeróbia foram estudadas as seguintes variáveis: Tmax: temperatura máxima alcançada ($^{\circ}\text{C}$); TTmax: tempo para alcançar a temperatura máxima (horas); Tquebra: tempo, em horas, necessário para a temperatura da silagem atingir 2°C acima da temperatura ambiente; AC5: acúmulo de temperatura da amostra em relação à temperatura ambiente durante cinco dias de exposição aeróbia ($^{\circ}\text{C}$) e AC10: acúmulo de temperatura da amostra em relação à temperatura ambiente durante dez dias de exposição aeróbia ($^{\circ}\text{C}$) (O'KIELY; CLANCY; DOYLE, 2001).

3.2.8 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas no tempo, com cinco tratamentos, quatro períodos de estocagem e quatro repetições, totalizando assim, 80 unidades experimentais. Os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey com probabilidade de 5%, utilizando-se o procedimento MIXED do programa SAS (2003).

3.3 Resultados

Neste item as variáveis estudadas estão apenas descritas, as comparações e discussões estão apresentadas no item 3.4. Nas tabelas com comparações estatísticas os valores foram comparados utilizando o critério de letras maiúsculas para efeito de tempo de armazenamento e letras minúsculas para efeitos de tratamentos. Valores descritos sem letra correspondente referem-se a valores que não diferiram estatisticamente.

3.3.1 Características fermentativas e microbiológicas das silagens

Na Tabela 2 está apresentada a estatística descritiva para as variáveis relativas ao padrão fermentativo e avaliações microbiológicas das silagens no momento da abertura dos silos experimentais. O tratamento das silagens com *L. buchneri* não afetou ($P<0,05$) o teor de MS e contagem de fungos filamentosos. Essas variáveis foram afetadas apenas pelo tempo de estocagem ($P<0,001$). O mesmo não aconteceu para o teor de ácido láctico presente nas amostras, que foi influenciado apenas pelo tratamento ($P<0,05$) mantendo-se inalterado nos tempos de abertura. Variáveis como BAL, leveduras, pH, ácido butírico e ácido acético foram influenciadas por ambos fatores, tratamento e tempo de estocagem, apresentando também interação, que foi desdobrada nas tabelas seguintes.

Tabela 2 - Estatística descritiva para variáveis relativas ao padrão de fermentação e microbiologia de silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Variável ¹	Valores ²				Efeito ³		Interação
	Média	CV (%)	Mín	Máx	Trat	Ab	Trat*Ab
MS, %	31,84	1,55	28,81	35,33	NS	**	**
BAL, log ufc/g	7,98	1,10	4,99	9,85	**	**	**
Levedura, log ufc/g	4,04	1,40	1,30	5,86	**	**	**
Fungo, log ufc/g	3,49	1,16	1,74	6,00	NS	**	NS
pH	3,83	0,14	3,67	4,07	**	**	**
Ácido acético, % MS	1,44	0,52	0,50	3,23	**	**	**
Ácido butírico, % MS	0,05	0,05	0,00	0,21	**	**	**
Ácido láctico, % MS	4,08	0,92	0,84	6,76	*	NS	NS

¹MS: matéria seca; ufc: unidades formadoras de colônias; ²CV: coeficiente de variação; Mín.: mínimo; Máx.: máximo; ³Trat: tratamento; Ab: abertura; ** $P<0,001$; * $P<0,05$; NS: não significativo

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de pH no momento da abertura dos silos. Na abertura com 15 dias de estocagem apenas o tratamento LB3x10⁵ apresentou valor de pH inferior ($P<0,05$) aos demais tratamentos. Com 60 dias de estocagem não houve diferença nos valores de pH entre os tratamentos no

momento da abertura. Nas aberturas subsequentes, com 90 e 150 dias, as silagens com maiores doses de *L. buchneri* apresentaram maiores valores de pH ($P < 0,05$). Os valores dos erros foram: $EPM_{15-d} = 0,066$; $EPM_{60-d} = 0,015$; $EPM_{90-d} = 0,010$ e $EPM_{150-d} = 0,029$.

Na Tabela 3 estão descritos os valores de pH das silagens nos diferentes tempos de estocagem. De maneira geral, os maiores períodos de armazenamento resultaram em maiores valores de pH ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Valor do pH no momento da abertura das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
15	3,73 ^{Ba}	3,72 ^{Ba}	3,68 ^{Cb}	3,72 ^{Ba}	3,73 ^{Ba}	0,003
60	3,70 ^B	3,71 ^B	3,76 ^B	3,70 ^B	3,70 ^B	0,007
90	3,98 ^{Ab}	4,02 ^{Aab}	4,01 ^{Aab}	4,03 ^{Aab}	4,05 ^{Aa}	0,005
150	3,80 ^{Ab}	3,83 ^{Bb}	3,86 ^{Bab}	3,93 ^{Aab}	3,98 ^{Aa}	0,013

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 0,009

Os teores de ácido acético estão apresentados na Tabela 4. O tratamento controle apresentou valores inferiores de ácido acético em relação às maiores doses de *L. buchneri* nas aberturas com 15, 60 e 150 dias. Estocagem de 150 dias apresentou maiores ($P < 0,05$) teores de ácido acético que aos 15 dias. No tempo 90 dias não foram detectadas diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 4 - Teor de ácido acético (% MS) das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM ²
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
15	0,69 ^b	0,91 ^{Bab}	1,15 ^{Ba}	1,32 ^{Ca}	1,29 ^{Ca}	0,036
60	0,72 ^d	1,33 ^{ABc}	1,62 ^{Ab}	2,27 ^{Aa}	1,88 ^{ABb}	0,029
90	0,98 ^a	1,05 ^{Ba}	1,29 ^{ABa}	1,44 ^{BCa}	1,59 ^{BCa}	0,048
150	1,18 ^b	1,82 ^{Aab}	1,86 ^{Aab}	2,10 ^{ABab}	2,43 ^{Aa}	0,076

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; ¹EPM = 0,057; ²EPM: erro padrão da média;

Os teores de ácido láctico não foram influenciados ($P > 0,05$) pelo tempo de estocagem das silagens. Observou-se decréscimo ($P < 0,05$) nessas concentrações com o aumento da dose de *L. buchneri*. O tratamento controle apresentou maior concentração, 4,70% MS e os tratamentos LB1x10⁵, LB3x10⁵, LB5x10⁵ e LB1x10⁶,

com concentrações de 4,05, 4,07, 3,90 e 3,67% MS, respectivamente (EPM= 0,226). Foi observada diferença apenas entre os tratamentos controle e LB1x10⁶ (P<0,05). Com relação à concentração de ácido butírico (Tabela 5) nas silagens, houve efeito do tratamento (P<0,05) apenas nas aberturas com 15 e 60 dias. O tempo de estocagem apresentou efeito (P<0,05) somente para as maiores doses de *L. buchneri* sendo esta bem variável entre os tratamentos.

Tabela 5 - Teor de ácido butírico (% MS) das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
15	0,043 ^C	0,048 ^C	0,060 ^{Abc}	0,073 ^{Bab}	0,090 ^{Aa}	0,002
60	0,000 ^b	0,028 ^b	0,000 ^{Bb}	0,210 ^{Aa}	0,000 ^{Cb}	0,006
90	0,043	0,040	0,000 ^B	0,000 ^C	0,000 ^C	0,004
150	0,028	0,093	0,088 ^A	0,098 ^B	0,073 ^B	0,006

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente (P<0,05) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média ¹EPM = 0,005

Nas Tabelas 6, 7 e 8, estão apresentados os valores de contagem de microrganismos. As contagens de BAL foram superiores nas silagens tratadas nas aberturas com 15, 90 e 150 dias (P<0,05). Na abertura com 60 dias de armazenamento não foram detectadas diferenças entre os tratamentos (P>0,05). Em todos os tratamentos houve decréscimo (P<0,05) na contagem de bactérias com o aumento do tempo de estocagem. No tratamento controle esse decréscimo ocorreu após 60 dias de armazenagem, enquanto nas silagens tratadas, as contagens de bactérias foram reduzidas somente com 150 dias de estocagem.

Tabela 6 - Contagem de bactérias ácido lácticas em silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
	(log ufc/g de forragem)					
15	8,28 ^{Ac}	8,63 ^{Ab}	8,74 ^{Aab}	8,92 ^{Aab}	8,99 ^{Aa}	0,026
60	7,25 ^A	7,84 ^A	8,53 ^{AB}	8,73 ^{AB}	8,44 ^{AB}	0,140
90	5,18 ^{Bb}	7,82 ^{ABa}	8,33 ^{ABa}	8,92 ^{ABa}	8,51 ^{ABa}	0,121
150	5,35 ^{Bb}	7,54 ^{Ba}	7,83 ^{Ba}	7,94 ^{Ba}	7,88 ^{Ba}	0,043

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente (P<0,05) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 0,107

A contagem de leveduras foi influenciada pelo tempo de armazenamento e concentração de *L. buchneri* (Tabela 7). Não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) no número de leveduras na primeira abertura, com dias 15 de armazenamento. Devido a erros de diluições, não foi possível a contagem de leveduras dos tratamentos $LB3 \times 10^5$, $LB5 \times 10^5$ e $LB1 \times 10^6$ na abertura com 60 dias de estocagem. Essas contagens foram inferiores a 3 log ufc/g de silagem fresca. Nas aberturas com 90 e 150 dias a população de leveduras foi superior ($P<0,05$) nos tratamentos controle e $LB1 \times 10^5$ quando comparados aos demais tratamentos. Em todos os tratamentos o tempo de armazenamento foi responsável pela diminuição das leveduras na silagem de milho.

Tabela 7 - Contagens de leveduras em silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	$LB1 \times 10^5$	$LB3 \times 10^5$	$LB5 \times 10^5$	$LB1 \times 10^6$	
	(log ufc/g de silagem)					
15	5,63 ^{Aa}	5,48 ^{Aa}	5,57 ^{Aa}	5,64 ^{Aa}	5,52 ^{Aa}	0,03
60	4,96 ^{Ba}	4,14 ^{Bb}	<3,0	<3,0	<3,0	-
90	4,83 ^{ABa}	4,23 ^{Ba}	2,78 ^{Bb}	1,86 ^{Bb}	1,98 ^{Bb}	0,11
150	4,43 ^{Ba}	3,84 ^{Ba}	2,77 ^{Bb}	2,27 ^{Bb}	2,33 ^{Bb}	0,08

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente ($P<0,05$) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média;¹EPM = 0,08

As contagens de fungos filamentosos não foram influenciadas pelos tratamentos ($P>0,05$). A população de fungos foi influenciada apenas pelo tempo de armazenamento, com decréscimo nas contagens com maiores tempos de armazenamento (Tabela 8). Na abertura 150, devido a erros de diluição, não foi possível quantificar a população de fungos, sendo essa população inferior a 3 log ucf/g de silagem.

Tabela 8 - Contagens de fungos em silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

	Abertura (dias)			
	15	60	90	150
Fungos, log ufc/g	4,55 ^a	3,94 ^a	2,72 ^b	-
EPM	0,238	0,314	0,137	-

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si estatisticamente ($P<0,05$) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média

3.3.2 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos

A estatística descritiva das variáveis relativas ao valor nutritivo das silagens está apresentada na Tabela 9. As concentrações de MS, MM e EE não foram alteradas pelo tratamento, e sofreram apenas influência do tempo de armazenamento. Os desdobramentos das interações e diferentes efeitos das entidades bromatológicas serão explorados nas tabelas e figuras seguintes.

Tabela 9 - Estatística descritiva para variáveis relativas ao valor nutritivo de silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Variável ¹	Valores ²				Efeito ³		Interação
	Média	CV (%)	Mín	Máx	Trat	Ab	Trat*Ab
MS, %	31,84	1,55	28,81	35,33	NS	**	**
MM, % MS	1,98	0,49	0,66	3,21	NS	*	NS
PB, % MS	7,20	0,69	5,32	8,34	**	**	**
EE, % MS	2,27	0,36	1,59	2,99	NS	**	NS
FDN, % MS	52,73	3,52	44,86	61,34	**	**	NS
FDA, % MS	37,23	2,30	32,55	43,70	**	**	*
CEL, % MS	30,35	2,06	26,99	35,18	*	**	NS
HEMI, % MS	17,55	1,48	13,92	21,07	*	**	*
LIG, % MS	6,63	1,22	4,30	8,87	*	**	**
AMIDO, % MS	20,65	3,78	11,05	27,82	*	**	NS
NFDA, % N total	6,62	1,38	4,46	8,75	**	**	NS
DVIVMS, %	69,69	1,60	65,89	73,74	**	**	*
DVIVMO, %	68,36	1,67	64,21	72,59	**	**	NS

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; NFDA: nitrogênio indisponível na FDA; CEL: celulose; HEMI: hemicelulose; LIG: lignina; EE: extrato etéreo; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; DVIVMO: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica; ²CV: coeficiente de variação; Mín.: mínimo; Máx.: máximo; ³Trat: tratamento; Ab: abertura; **P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo

O tempo de armazenamento dos silos provocou aumento (P<0,05) nos teores de matéria seca nas silagens tratadas até a abertura de 90 dias (Tabela 10). Devido ao elevado erro padrão da média na abertura de 150 dias não foram detectadas diferenças nessa abertura. Nessa abertura houve uma parcela perdida, e devido à estimativa desta parcela pelo programa SAS, (2003) o erro padrão da média foi aumentado, causando confundimento durante as comparações.

Tabela 10 - Teor de matéria seca das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵ (%)	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
15	31,3	30,3 ^B	30,0 ^B	30,5 ^B	30,1 ^B	0,090
60	32,2	29,4 ^B	30,4 ^B	30,6 ^{AB}	31,7 ^A	0,210
90	31,8	32,6 ^A	32,9 ^A	30,8 ^A	33,1 ^A	0,157
150	34,8	33,1 ^{AB}	33,3 ^{AB}	29,3 ^{AB}	32,9 ^{AB}	0,817

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 0,482

A Figura 1 apresenta o teor de extrato etéreo e matéria mineral das silagens nos diferentes tempos de estocagem. Os teores de EE aumentaram ($P < 0,05$) com o tempo e a matéria mineral manteve-se praticamente inalterada.

Figura 1 - Extrato etéreo e matéria mineral das silagens de milho nos diferentes tempos de armazenamento

Os teores de PB foram maiores ($P < 0,05$) nas silagens com maiores concentrações de *L. buchneri* (Tabela 11) sendo detectadas diferenças ($P < 0,05$) nas aberturas 15, 60 e 90 dias. Nas comparações de tempo de armazenamento foi observado aumento ($P < 0,05$) nos teores de PB.

Tabela 11 - Teor de proteína bruta das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
	(% MS)					
15	6,97 ^{Bab}	6,86 ^{Bab}	6,67 ^{Bb}	7,20 ^a	7,47 ^{Ba}	0,068
60	5,53 ^{Cc}	6,17 ^{Cc}	6,02 ^{Bbc}	7,23 ^a	7,10 ^{Ba}	0,053
90	7,40 ^{AB}	7,44 ^{AB}	7,44 ^A	7,46	7,54 ^B	0,037
150	7,65 ^{Ab}	7,79 ^{Aab}	7,85 ^{Aab}	7,99 ^{ab}	8,11 ^{Aa}	0,034

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente (P<0,05) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 0,056

O mesmo foi observado para os teores de lignina e DVIVMS (Tabelas 12 e 13). Os teores de lignina e DVIVMS apresentaram efeito de tratamento para a abertura de 60 dias, onde se observou que as maiores doses apresentaram menores (P<0,05) teores de lignina e maiores valores de DVIVMS.

Tabela 12 - Teor de lignina das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
	(% MS)					
15	4,8 ^B	4,8 ^C	5,4 ^B	4,6 ^C	5,3 ^B	0,118
60	7,5 ^{Aa}	7,3A ^{Ba}	6,6 ^{ABab}	6,0 ^{Bb}	5,8 ^{Bb}	0,110
90	7,4 ^A	7,0 ^B	7,1 ^A	7,2 ^A	6,9 ^A	0,083
150	7,8 ^A	8,5 ^A	7,7 ^A	7,7 ^A	7,3 ^A	0,151

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente (P<0,05) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 0,131

Tabela 13 - Digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
	(% MS)					
15	69,0 ^{AB}	68,5 ^{AB}	68,3	68,8 ^B	68,8 ^B	0,213
60	68,5 ^{Bab}	66,7 ^{Bb}	68,3 ^{ab}	69,5 ^{Ba}	70,5 ^{ABa}	0,214
90	69,6 ^{AB}	69,4 ^A	70,5	70,0 ^{AB}	71,2 ^A	0,160
150	73,3 ^A	70,1 ^A	71,0	72,3 ^A	71,6 ^A	0,262

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente (P<0,05) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 0,241

Os teores de FDA, FDN, celulose e hemicelulose diminuíram (P<0,05) com o tempo de armazenamento (Tabela 14 e Figura 2).

Tabela 14 - Teor de FDA das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
	(% MS)					
15	38,4	38,8 ^{AB}	39,3 ^A	38,0	39,4 ^A	0,341
60	38,6 ^{ab}	41,8 ^{Aa}	38,9 ^{Aab}	37,2 ^b	36,8 ^{ABb}	0,350
90	35,6	36,1 ^B	35,1 ^B	35,6	34,9 ^B	0,274
150	34,9	37,9 ^{AB}	36,4 ^{A^B}	34,6	35,6 ^{AB}	0,381

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente (P<0,05) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 0,379

Houve efeito de tratamento (P<0,05) no teores de FDA e hemicelulose apenas na abertura de 60 dias, onde as maiores doses *L. buchneri* resultaram em menores teores de FDA e hemicelulose.

Tabela 15 - Teor de hemicelulose das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
	(% MS)					
15	19,0 ^A	18,9 ^{AB}	19,4 ^A	18,6 ^A	18,0	0,267
60	18,7 ^{Aab}	19,1 ^{Aa}	19,0 ^{Aab}	16,6 ^{ABab}	16,5 ^b	0,229
90	17,1 ^{AB}	17,6 ^{AB}	17,6 ^{AB}	17,8 ^A	17,0	0,130
150	15,8 ^B	16,4 ^B	16,2 ^B	15,4 ^B	16,4	0,188

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente (P<0,05) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 0,234

A DVIVMO aumentou (P<0,05) com o tempo de estocagem (Figura 2).

Figura 2 - Digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica, fibra em detergente neutro e celulose de silagens de milho em diferentes tempos de armazenamento

O tratamento com a menor dose de *L. buchneri* apresentou DVIVMO inferior ($P<0,05$) e teores de FDN e celulose superiores ($P<0,05$) aos tratamentos $LB5 \times 10^5$ e $LB1 \times 10^6$ (Figura 3).

Figura 3 - Digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica, fibra em detergente neutro e celulose de silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri*

A concentração de amido foi maior ($P<0,05$) para as aberturas 90 e 150 dias (23,5 e 22,9%, respectivamente) seguido pela abertura 60 dias (20,7% MS) e pela abertura 15 dias (15,5% MS, Figura 4). O teor de N-FDA foi menor ($P<0,05$) nas aberturas de 90 e 150 dias. Os teores de N-FDA decresceram ($P<0,05$) com o aumento das doses de aditivo utilizado. O tratamento com menor dose de *L. buchneri* apresentou menor ($P<0,05$) teor de amido que os tratamentos controle, $LB5 \times 10^5$ e $LB1 \times 10^6$ (Figura 5).

Figura 4 - Teor de amido e N-FDA de silagens de milho em diferentes tempos de armazenamento

Figura 5 - Teor de amido e N-FDA de silagens de milho tratadas com diferentes doses de *L. buchneri*

3.3.3 Perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens

Na Tabela 16 estão apresentados os valores de perda de MS e variáveis relativas à estabilidade aeróbia das silagens. Para as variáveis de perda de MS, RMS, perdas por gases, efluentes e temperatura máxima, não houve efeito de tratamento ($P > 0,05$) nas silagens, as quais foram influenciadas apenas pelo efeito do tempo de armazenamento. As perdas de MS, perda por gases, e temperatura máxima diminuíram ($P < 0,001$) ao longo do tempo. Observa-se nas Tabelas 17 e 18, aumento na produção de efluentes e RMS com maior tempo de armazenamento ($P < 0,001$). As demais variáveis (Tempo Max, Perda, AC5 e AC10) foram

influenciadas pelo tratamento e tempo de abertura. Devido à interação desses fatores, essas variáveis serão desdobradas nas tabelas seguintes.

Tabela 16 - Estatística descritiva para variáveis relativas às perdas e estabilidade aeróbia de silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Variável ¹	Valores ²				Efeito ³		Interaçã o
	Média	CV (%)	Mín	Máx	Tra t	A b	Trat*Ab
Perda MS, %	6,94	4,78	0,68	36,73	NS	**	NS
RMS, %	93,1	4,78	63,3	99,3	NS	**	NS
Gases, % MS	6,94	4,78	0,68	36,73	NS	**	NS
Efluente, kg/t MV	2,95	2,18	0,00	6,77	NS	**	NS
Temperatura Max, °C	37,60	3,67	29,50	44,50	NS	**	NS
Tempo Max, horas	131,50	70,57	38,50	240,00	**	**	**
Perda estabilidade, horas	80,29	54,25	16,75	204,75	**	**	**
AC5, °C	17,13	16,23	-6,86	44,36	**	**	**
AC10, °C	47,97	17,31	10,96	81,85	**	**	**

¹MS: matéria seca; AC5: acúmulo de temperatura durante cinco dias; AC10: acúmulo de temperatura durante dez dias; ²CV: coeficiente de variação; Mín.: mínimo; Máx.: máximo; ³trat: tratamento; Ab: abertura; **P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo

Tabela 17 - Perdas de MS, recuperação de MS, perdas por gases e efluentes em silagens de milho em diferentes tempos de armazenamento

Variável ¹	Abertura (dias)				EPM
	15	60	90	150	
Perda MS, %	9,71 ^a	9,48 ^a	4,80 ^b	3,38 ^b	0,75
RMS, %	90,29 ^b	90,52 ^b	95,20 ^a	96,62 ^a	0,75
Gases, % MS	9,71 ^a	9,48 ^a	4,80 ^b	3,38 ^b	0,75
Efluente, kg/t MV	1,24 ^c	---	3,07 ^b	4,59 ^a	0,44

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si estatisticamente (P<0,05) pelo teste de Tukey; EPM_{15-d} = 3,36; EPM_{60-d} = 1,16; EPM_{90-d} = 0,934 e EPM_{150-d} = 1,23

Tabela 18 - Temperatura máxima das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento, durante a exposição aeróbia

	Abertura (dias)			
	15	60	90	150
Tmáx, °C	40,48 ^a	40,37 ^a	35,27 ^b	36,03 ^b
EPM ¹	1,063	0,327	0,484	0,401

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; ¹EPM: erro padrão da média

Nas Figuras 6, 7, 8 e 9 estão apresentadas as evoluções temporais das temperaturas das silagens durante o ensaio de estabilidade aeróbia. Os dados e comparações provenientes dessas figuras estão apresentados nas Tabelas 19, 20 e 21. Aos 15 dias as silagens aditivadas não mostraram melhora na estabilidade aeróbia, com picos de temperaturas antecipados e superiores ao controle.

Figura 6 - Variação temporal da temperatura durante a exposição aeróbia de silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* com 15 dias de armazenamento

Figura 7 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbia de silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* com 60 dias de armazenamento

Enquanto aos 60 dias observa-se que o controle apresentou o primeiro pico embora os valores tenham sido próximos. Aos 90 dias o efeito foi mais evidente, com o tratamento controle atingindo o primeiro pico com temperatura cerca de 5°C superior à silagem aditivada com 1×10^5 ufc/g.

Figura 8 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbia de silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* com 90 dias de armazenamento

Aos 150 dias o tratamento controle também atingiu o pico antes das silagens aditivadas (terceiro dia), e com temperatura cerca de 4°C superior à menor dose de *L. buchneri*.

Figura 9 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbica de silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* com 150 dias de armazenamento

O tempo para atingir a temperatura máxima diferiu ($P < 0,05$) entre as doses de *L. buchneri*, bem como entre os períodos de armazenamento das silagens. Nas aberturas com 60, 90 e 150 dias de armazenamento foi observado maior ($P < 0,05$) tempo para atingir a temperatura máxima nas silagens tratadas com doses acima de 3×10^5 ufc/g. O tempo para abertura também influenciou essa variável, onde maiores tempos de armazenamento propiciaram maiores ($P < 0,05$) tempos para atingir a temperatura máxima (Tabela 19) e para a perda da estabilidade aeróbica (Tabela 20).

Tabela 19 - Tempo para atingir a temperatura máxima durante a exposição aeróbica das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
	(horas)					
15	57,3 ^B	41,9 ^C	49,0 ^C	57,1 ^C	63,4 ^B	1,93
60	57,3 ^{Bb}	74,8 ^{Bab}	88,1 ^{Bab}	93,2 ^{Ba}	92,3 ^{Bab}	2,70
90	59,2 ^{Bb}	76,7 ^{BCb}	186,0 ^{Aa}	222,4 ^{Aa}	230,1 ^{Aa}	4,98
150	151,2 ^{Ab}	171,8 ^{Aab}	181,2 ^{Aab}	213,1 ^{Aa}	215,3 ^{Aa}	4,92

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 4,33

O tempo para a temperatura das silagens ultrapassar em 2°C a temperatura ambiente, denominado tempo para perda de estabilidade, diferiu ($P < 0,05$) entre os tratamentos utilizados ($LB3 \times 10^5$, $LB5 \times 10^5$ e $LB1 \times 10^6$). As silagens com doses superiores de *L. buchneri* apresentaram perda de estabilidade em momento posterior às silagens controle nas aberturas 60 e 150 dias (Tabela 20).

Tabela 20 - Tempo para perda da estabilidade aeróbia das silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	$LB1 \times 10^5$	$LB3 \times 10^5$ (horas)	$LB5 \times 10^5$	$LB1 \times 10^6$	
15	38,1 ^a	20,6 ^{Bb}	21,3 ^{Cb}	32,2 ^{Cab}	39,3 ^{Ca}	1,30
60	44,8 ^c	52,2 ^{Abc}	61,9 ^{Bab}	68,0 ^{Ba}	64,5 ^{Bab}	1,29
90	41,5 ^b	51,1 ^{ABb}	83,0 ^{ABb}	173,2 ^{Aa}	169,7 ^{Aa}	6,48
150	45,9 ^c	55,0 ^{Ac}	96,2 ^{Ab}	160,7 ^{Aa}	153,6 ^{Aa}	2,03

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 3,93

Os acúmulos de temperatura da silagem acima da temperatura ambiente ao longo dos 5 e 10 dias de exposição aeróbia, foram afetados ($P < 0,05$) pelos tratamentos, bem como pelo tempo de armazenamento (Tabelas 21 e 22). Nas aberturas com 90 e 150 dias, as silagens controle apresentaram maior ($P < 0,05$) valor acumulado durante 5 dias (32,1 e 16,5°C) e 10 dias (71,0 e 64°C) em relação aos tratamentos $LB5 \times 10^5$ e $LB1 \times 10^6$.

Tabela 21 - Temperaturas acumuladas aos 5 dias de exposição aeróbia nas silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	$LB1 \times 10^5$	$LB3 \times 10^5$ (°C)	$LB5 \times 10^5$	$LB1 \times 10^6$	
15	19,3 ^{AB}	34,8 ^{AB}	38,3 ^A	40,6 ^A	31,5 ^A	2,70
60	30,4 ^A	31,9 ^A	27,9 ^A	24,3 ^A	24,9 ^A	1,07
90	32,1 ^{Aa}	24,7 ^{ABab}	8,85 ^{Bbc}	-3,73 ^{Bc}	-1,08 ^{Bc}	1,47
150	16,5 ^{Ba}	14,2 ^{Ba}	0,10 ^{Bb}	-3,10 ^{Bb}	-3,90 ^{Bb}	0,60

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 1,84

O tempo de armazenamento diminuiu ($P<0,05$) a temperatura acumulada tanto aos 5 como aos 10 dias nos tratamentos $LB5 \times 10^5$ e $LB1 \times 10^6$.

Tabela 22 - Temperaturas acumuladas aos 10 dias de exposição aeróbia nas silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* em diferentes tempos de armazenamento

Abertura (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	$LB1 \times 10^5$	$LB3 \times 10^5$	$LB5 \times 10^5$	$LB1 \times 10^6$	
			(°C)			
15	26,0	51,3	52,7	52,6 ^{AB}	46,4 ^{AB}	4,05
60	58,4	55,7	60,2	58,0 ^A	62,7 ^A	2,23
90	71,0 ^a	60,1 ^a	51,2 ^{ab}	24,1 ^{Bb}	23,4 ^{Bb}	2,71
150	64,0 ^a	57,2 ^a	46,0 ^{ab}	29,1 ^{Bb}	30,5 ^{Bb}	1,78

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente ($P<0,05$) pelo teste de Tukey; EPM: erro padrão da média; ¹EPM = 3,15

Na Tabela 23 pode ser verificada que a população de leveduras na abertura 15 dias foi superior ($P<0,05$) nos dias cinco e 10 da estabilidade. No tempo zero, abertura dos silos experimentais, não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Entretanto, nos demais tempos os tratamentos $LB1 \times 10^5$ e $LB1 \times 10^6$ apresentaram menores ($P<0,05$) contagens de leveduras. Na abertura com 60 dias não foi possível a contagem de leveduras durante a estabilidade aeróbia devido a erros de diluição.

Aos dez dias da exposição aeróbia as duas maiores doses de *L. buchneri* resultaram em menor ($P<0,05$) contagem de leveduras em relação à silagem controle. Ao longo da estabilidade aeróbia houve aumento ($P<0,05$) na contagem de leveduras para todos tratamentos.

Tabela 23 - Contagens de leveduras durante a exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* após 15 dias de armazenamento

Exposição (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	$LB1 \times 10^5$	$LB3 \times 10^5$	$LB5 \times 10^5$	$LB1 \times 10^6$	
			(log ufg/g forragem)			
0	5,63 ^B	5,47 ^B	5,56 ^B	5,63 ^B	5,51 ^B	0,034
5	9,15 ^{Aab}	9,15 ^{Aab}	9,24 ^{Aa}	8,99 ^{Aab}	8,75 ^{Ab}	
10	9,32 ^{Aa}	9,13 ^{Aab}	9,00 ^{Aabc}	8,91 ^{Abc}	8,69 ^{Ac}	

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente ($P<0,05$) pelo teste de Tukey; ¹EPM: erro padrão da média; EPM = 0,044

Na abertura 90 dias os tratamentos com maiores doses de inoculante apresentaram menores ($P<0,05$) contagens de leveduras no momento da abertura e

no quinto dia da estabilidade aeróbia (Tabela 24). A contagem de leveduras aumentou ($P < 0,05$) durante a exposição aeróbia em todos os tratamentos.

Tabela 24 - Contagem de leveduras durante a exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* após 90 dias de armazenamento

Exposição o (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
	(log ufg/g forragem)					
0	4,83 ^{Ba}	4,22 ^{Bb}	2,78 ^{Bc}	1,86 ^{Cc}	1,98 ^{Cc}	0,08 5
5	9,00 ^{Aa}	9,10 ^{Aa}	8,97 ^{Aa}	7,23 ^{Bb}	7,40 ^{Bb}	
10	9,05 ^A	9,19 ^A	9,13 ^A	9,43 ^A	9,29 ^A	

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; ¹EPM: erro padrão da média; EPM = 0,110

Na Tabela 25 estão apresentadas as contagens de leveduras durante a exposição aeróbia após o armazenamento de 150 dias. Foi verificado que os tratamentos LB1x10⁵ e LB1x10⁶ foram mais efetivos, em relação aos demais tratamentos, em reduzir a população de leveduras nos dias 0, 2 e 5 dias da exposição aeróbia. As maiores contagens de leveduras desses tratamentos ocorreram apenas após sete dias, enquanto nos demais tratamentos esse pico foi atingido no quinto dia da exposição aeróbia.

Tabela 25 - Contagem de leveduras durante a exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* após 150 dias de armazenamento

Exposição (dias)	Tratamentos ¹					EPM
	Controle	LB1x10 ⁵	LB3x10 ⁵	LB5x10 ⁵	LB1x10 ⁶	
	(log ufg/g forragem)					
0	4,42 ^{Da}	3,84 ^{Dab}	2,76 ^{Cbc}	2,27 ^{Dc}	2,33 ^{Dc}	0,117
2	7,62 ^{BCa}	7,17 ^{Bab}	6,18 ^{Bb}	3,75 ^{Cc}	3,73 ^{Dcc}	0,113
4	6,82 ^{Ca}	5,68 ^{Cab}	4,81 ^{Bb}	5,76 ^{Bab}	5,78 ^{Cab}	0,117
5	9,06 ^{Aa}	9,03 ^{Aa}	8,83 ^{Aa}	6,94 ^{Bb}	7,21 ^{Bb}	0,113
7	9,15 ^A	9,25 ^A	9,09 ^A	8,41 ^A	8,56 ^A	0,113
10	8,70 ^{AB}	8,87 ^A	8,74 ^A	8,76 ^A	8,55 ^A	0,113

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, diferem entre si estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; ¹EPM: erro padrão da média; EPM = 0,103

Nas Figuras 10, 11, 12 e 13 estão apresentadas as evoluções temporais dos valores de pH durante o período de exposição aeróbia nas quatro diferentes aberturas. Durante a exposição aeróbia das aberturas com 15 e 60 dias, não houve

diferenças entre os tratamentos. Entretanto nas aberturas subsequentes, o elevação do pH foi postergada nas silagens com inoculação superior à 3×10^5 . Após 15 dias de armazenamento, o pH começa a se elevar após 28 horas de exposição aeróbia, enquanto na abertura com 60 dias isso ocorreu a partir de 48 horas de exposição.

Figura 10 - Evolução do pH durante exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* com 15 dias de armazenamento

Após 90 e 150 dias de armazenamento, o pH dos tratamentos controle e LB 1×10^5 começou a se elevar após 48 horas, enquanto que para as doses mais altas essa elevação ocorreu somente após 120 horas de exposição. No caso do tratamento com dose 5×10^5 após 150 dias de estocagem, esse aumento ocorreu somente após 144 horas de exposição aeróbia.

Figura 11 - Evolução do pH durante exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* com 60 dias de armazenamento

Figura 12 - Evolução do pH durante exposição aeróbia em silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* com 90 dias de armazenamento

Figura 13 - Evolução do pH durante exposição aeróbica em silagens de milho tratadas com doses crescentes de *L. buchneri* com 150 dias de armazenamento

3.4 Discussão

3.4.1 Características da forragem no momento da ensilagem

O ponto ideal de colheita para ensilar a cultura do milho é estabelecido com base no teor de matéria seca da planta inteira. McDonald; Henderson; Heron (1991), recomendam a colheita do milho quando esse apresentar teores de MS entre 32 e 35%. Neste trabalho foi respeitada essa premissa e as plantas foram colhidas quando apresentavam 33,2% de MS (Tabela 1).

Foram observados teores de FDN e FDA de 55,38 e 35,11% MS, respectivamente, valores próximos aos encontrados na literatura onde plantas de milho colhidas com 30% de MS, alcançaram 55,5% de FDN e 32,5% de FDA (FILYA; SUCU, 2010).

Nishino et al. (2004) observaram teores médios de PB de 6,56% MS, quando a planta estava no momento ideal de colheita para ensilagem. O teor de PB encontrado nesse experimento está coerente com os relatos desses autores, onde se encontrou valor médio de 6,22% MS. Russell et al. (1992) observaram variações na DVIVMS da planta em híbridos de milho colhidos entre 34,8 e 51,4% de MS. Para estes materiais, os valores de DVIVMS estiveram entre 71,9 e 73,1%, semelhantes aos encontrados no presente experimento, de 72,1 a 73,8%.

3.4.2 Características fermentativas e microbiológicas das silagens

Após 90 dias de armazenamento, os valores de pH diferiram entre os tratamentos, como esperado. Os tratamentos inoculados apresentaram valores maiores de pH. Provavelmente esse acréscimo aconteceu pela transformação de ácido láctico em acético, sendo esse um ácido fraco, possibilitando o aumento do pH (PAHLOW et al., 2003). As concentrações de ácido láctico decresceram com o aumento na dose do aditivo, variando de 4,70% MS no tratamento controle até 3,67% MS no tratamento LB1x10⁶ (Tabela 3).

Os teores de ácido acético do presente estudo foram superiores nas silagens inoculadas com *L. buchneri* e armazenadas por mais de 60 dias (Tabela 4), o que corrobora com o observado por Taylor;Kung (2002), em silagem de grão úmido de milho. Entretanto, os autores não relataram aumento consistente na concentração de ácido acético a partir de inoculação com *L. buchneri* até 49 dias após a ensilagem.

O aditivo utilizado, composto por *L. buchneri*, caracteriza-se por apresentar rota metabólica heterolática, com capacidade de produzir ácido acético durante a fermentação, com conseqüente controle efetivo de leveduras e fungos filamentosos (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999; DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; VAN WIKSELAAR; 1999; KUNG; RANJIT, 2001; FILYA, 2001, 2003; FILYA; KARABULUT; SUCU, 2002; RANJIT; TAYLOR; KUNG; 2002; WEINBERG et al., 2002; PAHLOW et al., 2003).

Os ácidos fracos atuam no interior das células das leveduras e fungos. Este processo se inicia porque em pH inferior ao pKa destes ácidos fracos (4,87 e 4,73 para os ácidos propiônico e acético, respectivamente), tais ácidos se mantêm na forma não dissociada e assim, apresentam alta afinidade com a membrana dos microrganismos, a qual é permeável. Uma vez dentro das células, os ácidos são dissociados porque o pH interno do microrganismo é cerca de 7,0 (superior ao pKa). Assim, os ácidos liberam íons H⁺ no interior das células dos microrganismos que precisam gastar energia para expulsar esses íons e acabam tendo seu crescimento retardado, podendo também ocorrer morte celular (WARTH, 1977).

Filya (2003) estudando silagem de milho com 23,5% MS observou teores de ácido láctico variando entre 4,04 e 2,76% MS para silagem controle e inoculada com 1x10⁶ ufc/g de *L. buchneri*, respectivamente, após 90 dias de armazenamento. O

presente estudo encontrou concentrações variando de 3,67 até 4,70% MS de ácido láctico.

A produção de ácido butírico em excesso é característica da presença de clostrídeos na forragem ou de enterobactérias, como produto secundário da deaminação, resultando em perdas significativas na massa ensilada e redução do valor nutritivo. As concentrações típicas de butírico em silagens com atividade clostrídica são superiores a 2,5% MS (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Portanto, nas silagens avaliadas nesse estudo, onde os teores mantiveram-se abaixo de 0,21% MS, pode-se afirmar que a atividade de clostrídeo foi muito baixa. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores em silagens de milho, com valores abaixo de 0,25% MS (QUEIROZ et al., 2012).

Devido à natureza do aditivo utilizado, nas silagens tratadas foi verificado maior população de bactérias ácido lácticas em todos os períodos de armazenamento (Figura 2). A diferença entre o tratamento controle e $LB5 \times 10^5$ chegou a 2,5 log ufc/g após 150 dias de armazenamento, variando de 5,35 log ufc/g até 7,88 log ufc/g. Schmidt;Kung (2010), utilizando *L. buchneri* na dose de 4×10^5 log ufc/g em silagens de milho com 120 dias de armazenamento observaram variação na população de BAL de 5,72 até 8,32 log ufc/g de forragem.

No tratamento controle a população de BAL diminui de 8,28 log ufc/g na abertura com 15 dias para 5,35 log ufc/g após 150 dias de armazenamento. Por outro lado, as populações nos tratamentos com aditivo não decresceram à valores inferiores a 7,54 log ufc/g (Tabela 6). Este cenário condiz com dados encontrados na literatura, onde Nishino et al. (2004) também observou declínio no tratamento controle após 60 dias de armazenamento (de 8,05 para 5,72 log ufc/g). Após 120 dias de armazenamento, Nishino et al. (2003) observou população de BAL de 8,01 log ufc/g de silagem, similar ao encontrado no presente estudo.

A população de leveduras na abertura com 15 dias não apresentou diferenças entre os tratamentos, e nas aberturas aos 90 e 150 dias os tratamentos sob doses maiores que 3×10^5 foram superiores aos demais tratamentos. Essas evidências podem ser explicadas segundo relatos de McDonald; Henderson; Heron (1991), uma vez que após o termino da ensilagem a acidificação inicia-se pela ação das bactérias homoláticas, as quais dominam o ambiente durante 60 dias. Depois desse momento ocorre um gradual declínio dessa população, concomitantemente com acréscimo na

população de bactérias heteroláticas, as quais dominam o ambiente até o fim da fermentação.

Filya (2003) observaram esse efeito no segundo dia de ensilagem em silagens de milho e sorgo com baixo teor de MS, enquanto Driehuis et al. (1999) relataram período de 20 dias para observar o efeito na silagem de milho.

A redução na população de fungos ao longo dos tempos de estocagem também mostram os efeitos positivos do *L. buchneri*. Filya (2003), trabalhando com silagem de milho também observou menores contagens de fungos após 90 dias de armazenamento.

3.4.3 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos

Os teores de MS foram influenciados pelo tempo de armazenamento (Tabela 10), com acréscimo ($P<0,05$) nos valores. Kleinschmit;Kung (2006) também observaram ligeiros acréscimos no teor de MS de silagens de milho aditivadas com *L. buchneri* e *Pediococcus pentosaceus*, ao longo de diversos períodos de estocagem (14, 28, 42, 56, 70, 282 e 361 dias). Já as concentrações de MM mantiveram-se praticamente inalteradas.

Para as entidades bromatológicas relacionadas à fibra, como FDN, FDA, celulose e hemicelulose houve efeito do tempo de estocagem, com diminuição ($P<0,05$) nas concentrações. Os efeitos mais evidentes foram observados nas frações celulose e hemicelulose que tiveram suas menores concentrações após 90 dias, resultando assim, em menores ($P<0,05$) teores de FDN (Figura 4). Filya;Sucu (2010) também observaram redução nos teores de FDN em silagens tratadas com 1×10^6 ufc/g de *L. buchneri* após 90 dias de armazenamento. Os valores decresceram de 55,5 para 52,9% MS. Junges (2010), verificou reduções nos teores de FDN de 49,0% na ensilagem para 46,3% na média dos dois tratamentos, controle e aditivo microbiano, após 120 dias de armazenamento. Hallada; Sapienza;Taysom (2008) verificaram aumento constante na digestibilidade *in situ* da FDN em silagens de milho, elevando-se 1,2 unidades percentuais ao mês entre o dia 1 e 330 de armazenamento, atingindo um platô após 180 dias.

Há casos em que a fração hemicelulose sofre hidrólise ácida parcial em silagens, levando à redução da fração fibra insolúvel em detergente neutro (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991), o que pode explicar, ao menos parcialmente, tal comportamento no presente estudo.

Os teores de EE, lignina e amido aumentaram com o maior tempo de armazenamento, o que pode ser explicado pelo simples fato da proporcionalidade dos nutrientes, pois com a diminuição dos teores de fibra, as demais entidades aumentam proporcionalmente em decorrência da maior concentração relativa.

3.4.4 Perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens

Os resultados de perdas e recuperação de matéria seca (RMS), assim como produção de gases não seguem a expectativa de silagens tratadas exclusivamente com *L. buchneri* (Tabela 17). Em meta-análise publicada por Kleinschmit;Kung (2006), os autores demonstraram que silagens tratadas com doses superiores à 100.000 ufc/g de *L. buchneri* resultam em silagens com ligeiro acréscimo em perdas de matéria seca quando comparadas às silagens controle. Entretanto, Kleinschmit;Kung (2006b) também observaram maiores recuperações de matéria seca em silagens tratadas com *L. buchneri* armazenadas por longos períodos. Os silos abertos aos 14 dias tiveram RMS de 91,5% enquanto silos armazenados por 282 dias tiveram RMS de 96,2%. Os motivos desse cenário ainda não estão elucidados na literatura, mas provavelmente estariam associados à metodologia empregada para essa avaliação.

O principal fator que influencia a produção de efluente em silagens é o teor de MS da forragem. Segundo McDonald;Henderson;Heron, (1991), plantas ensiladas com teores de MS entre 25 e 30% apresentam produção reduzida de efluente. Portanto, as perdas encontradas neste estudo, entre 1,24 e 4,59 kg/t MV, são baixas, representando perdas inferiores a 0,5% na matéria original. Estes valores são semelhantes aos encontrados em silagens de cana-de-açúcar, com 32% MS onde foram produzidos 6,9 kg/t MV de efluentes (CAVALI et al., 2010).

Na Tabela 18 pode ser verificado que maiores períodos de armazenamento das silagens diminuíram a temperatura máxima alcançada durante a exposição aeróbia, independente do tratamento. Com relação às variáveis analisadas durante essa fase de exposição aeróbia de silagens sob doses crescentes de *L. buchneri*, em diferentes tempos de armazenamento, houve superioridade para as silagens com doses maiores de 5×10^5 ufc/g e armazenadas no mínimo durante 90 dias.

Na Tabela 19 podem ser observados os tempos para atingir a temperatura máxima, os quais foram inferiores nas silagens dos tratamentos controle e LB1x10⁵, bem como nas aberturas com 15 e 60 dias. Essa tendência também foi observada

para a “perda de estabilidade” referindo-se ao tempo necessário pra que a temperatura das silagens supere dois graus Celsius em relação à temperatura ambiente (Tabela 20).

Na Tabela 21 fica evidenciado que nas silagens tratadas, e com 90 dias de armazenamento, houve menor acúmulo de temperatura em 5 dias de exposição aeróbia. Também observou-se que os tratamentos $LB5 \times 10^5$ e $LB1 \times 10^6$ foram superiores aos tratamentos controle e $LB1 \times 10^5$ após 90 dias (-3,73 e 1,08°C vs. 32,1 e 24,7°C, respectivamente). O tempo de armazenamento das silagens dos tratamentos controle, $LB1 \times 10^5$ e $LB3 \times 10^5$ não influenciou o acúmulo de temperatura durante 10 dias de exposição aeróbia (Tabela 22). Novamente, a partir de 90 dias de estocagem, as silagens dos tratamentos $LB5 \times 10^5$ e $LB1 \times 10^6$ foram superiores ($P < 0,05$) aos tratamentos controle e $LB1 \times 10^5$ no tocante à estabilidade em aerobiose.

Essas diferenças podem ser explicadas com a relação entre produção de ácido acético e a população de leveduras. Nas aberturas 90 e 150 dias, foram verificadas menores ($P < 0,05$) contagens de leveduras e maiores concentrações de ácido acético nas silagens dos tratamentos $LB5 \times 10^5$ e $LB1 \times 10^6$. Esse fato corrobora com relatos de que a atividade do *L. buchneri* é mais eficiente quando as silagens são armazenados por períodos superiores a 60 dias (DRIEHUIS et al., 1999; OUDE ELFERINK et al., 2001; KUNG Jr. et al., 2003). A atividade desse aditivo também é dependente da dose utilizada, onde sua maior eficiência ocorre com a utilização de doses superiores a 1×10^6 (RANJIT; KUNG, 2000; TAYLOR et al., 2002). Para fins de recomendação de manejo, existem combinações ótimas de dose e tempo para abertura, sugerindo que para períodos muito curtos de armazenamento possa haver compensação parcial com aumento da dose.

Segundo McDonald; Henderson; Heron (1991) as leveduras são os primeiros microrganismos que iniciam a degradação da silagem, sendo os principais responsáveis pela deterioração aeróbia, pois são capazes de se desenvolver em baixas concentrações de oxigênio e em ambiente com pH ácido ($pH < 4,0$). Outros microrganismos como bactérias aeróbias e fungos também estão associados ao processo de degradação aeróbia da silagem.

Os fungos, as leveduras e algumas espécies de bactérias promovem a assimilação aeróbia de ácido láctico da silagem, o qual é degradado até dióxido de

carbono e água, resultando em excessiva produção de calor e perdas de nutrientes (PAHLOW et al., 2003).

Durante a exposição aeróbia, após a abertura com 15 dias de armazenamento, as silagens apresentaram em média 5,56 log ufc/g de leveduras (Tabela 23). Provavelmente devido a essa alta contagem de leveduras no momento da abertura, no quinto dia de exposição todos tratamentos atingiram as maiores contagens de levedura.

A evolução de pH também acompanhou essa tendência, com todas silagens atingindo altos valores de pH após 88 horas de exposição aeróbia (Figura 12). McDonald; Henderson; Heron (1991) sugerem que silagens com população de leveduras iguais ou maiores que 10^5 ufc/g são menos estáveis em aerobiose.

Segundo Kung; Stokes; Lin (2003), o perfil de fermentação desejável nem sempre evita as perdas após a abertura dos silos, sendo que em alguns casos pode aumentá-las. Silagens caracterizadas por alta concentração e a predominância de ácido láctico, bem como presença de açúcares remanescentes, são mais afetadas pela deterioração aeróbia (WEINBERG; MUCK, 1996). Além disso, McDonald; Henderson; Heron (1991) descreveram que a degradação desse ácido se torna benéfica para a elevação do pH da silagem, permitindo o crescimento de microrganismos oportunistas como bactérias e mofo.

A elevação do pH das silagens ocorreu possivelmente pelo consumo de ácido láctico presente nas silagens por microrganismos deterioradores, principalmente leveduras (PAHLOW et al., 2003). Na Figura 13 foi possível verificar que as silagens armazenadas por 60 dias começaram a aumentar os valores de pH após 48 horas de exposição aeróbia. A partir desse momento, o tratamento controle apresentou maiores valores de pH até 144 horas de exposição ao oxigênio. Entretanto, na abertura subsequente (90 dias) a inoculação com doses superiores a 5×10^5 de *L. buchneri* foram eficientes em manter o pH estável até o quinto dia da exposição aeróbia, o que também refletiu em menor ($P < 0,05$) contagem de leveduras (Tabela 24). Filya (2003) trabalhando com silagem de milho e inoculação de *L. buchneri* na dose de 1×10^6 ufc/g também encontrou manutenção dos valores de pH até o quinto dia da exposição aeróbia, com 90 dias de armazenamento.

Na abertura após 150 dias foi constatado menor população de leveduras nos tratamentos LB 5×10^5 e LB 1×10^6 , até o quinto dia da exposição aeróbia (Tabela 25). Enquanto os tratamentos controle, LB 1×10^5 e LB 3×10^5 atingiram o pico de contagem

leveduras no quinto dia da exposição, os tratamentos com maiores doses foram eficientes em controlá-las. Essa menor população de leveduras refletiu na evolução temporal do pH, onde este se manteve estável até 120 horas de exposição aeróbia.

3.5 Conclusões

Inoculação com *Lactobacillus buchneri* (NCIMB 40788) reduz a sobrevivência de leveduras durante a fase de armazenamento e o crescimento durante a exposição ao oxigênio, melhorando a estabilidade aeróbia de silagem de milho em ambiente tropical.

O maior tempo de armazenamento da silagem de milho resultou em maior valor nutritivo e perfil microbiológico favorável quanto à fermentação e estabilidade em aerobiose.

O aditivo *Lactobacillus buchneri* foi efetivo em manter estabilidade aeróbia nas silagens após 60 dias de armazenamento, com doses superiores a 5×10^5 ufc/g forragem.

Doses mais elevadas poderiam compensar parcialmente o menor tempo de armazenamento das silagens.

Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117 p.

BERZAGHI, P.; COZZI, G.; ANDRIGHETTO, I. The use of near infrared analysis for *in situ* studies. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.80, n.12, p.3263-3270, 1997.

BEUCHAT, L. R.; COPELAND, M.S.; CURIALE, T.; DANISAVICH, V.; GANGAR, B.W.; KING, T.L.; LAWLIS, R.O.; LIKIN, J.; OKWUSOA, C.F.; SMITH, TOWNSEND, D.E. Comparison of the simplate total plate count method with petrifilm, redigel, and conventional pour-plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 1, p.14-18, 1998.

CAVALI, J.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C; PORTO, M. O.; FERNANDES, F. E. P.; GARCIA, R. Mixed sugarcane and elephant grass silages with or without bacterial Inoculant **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa,, v.39, n.3, p.462-470, 2010.

COZZOLINO, D.; ACOSTA, Y.; GARCIA, J. Application of near infrared reflectancy spectroscopy (NIRS) to forage evaluation in Uruguay. In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 19., 2001. São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 370.

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

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VAN WIKSELAAR, P.G. *Lactobacillus buchneri* improves aerobic stability of laboratory and farm scale whole crop maize silage but does not affect feed intake and milk production of dairy cows. In: PAULY, T.; LINGVALL P., BURSTEDT E.; KNUTSSON, K.G.; LINDGREN, S.; MURPHY, M.; WIKTORSSON, H. (Eds) **Proceedings of the 12th International Silage Conference**, Uppsala, p. 264–265 ,1999.

FILYA, I. Aerobic stability of sorghum and maize silages treated with homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria Proc. Turkey-Israeli **Workshop on Silage and Agricultural By-Products for High Lactating Cows**, Bet Dagan, p. 24–26, 2001.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* , with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 1080-1086, 2003.

FILYA, I.; KARABULUT, A.; SUCU, E., The effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of maize silage in warm climate Proc. **XIII International Silage Conference, Auchincruive**, Ayr, Scotland, pp. 192–193, 2002.

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

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

HALLADA, C. M.; D.A. SAPIENZA; D. TAYSOM. Effect of length of time ensiled on dry matter, starch and fiber digestibility in whole plant corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, E-Suppl. 2/J. Dairy Sci. v. 91, E-Suppl. 1. 2008.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, R.A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia** Viçosa, v. 36, p. 101-119, 2007.

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

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

_____. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 10, p. 3999-4004, 2006b.

KNIGHT, M.; NEWMAN, M.; BENZINGER, K.; NEUFANG, J.; AGIN, J.; MCALLISTER,; RAMOS, M. Comparison of the petrifilm dry rehydratable film and conventional culture methods for enumeration of yeasts and molds in foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 80, n. 4, p. 806-823, 1997.

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

KUNG, L.; M. R. STOKES; C. J. LIN. Silage additives. in **Silage Science and Technology**. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, ed. Am. Soc. Agron., Crop Sci. Soc. Am., Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI. p. 305–360. 2003.

McDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. **The biochemistry of silage**. Manchester: John Wiley, 1991. p.81-151

NISHINO, N.; WADA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H. Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 8, p. 2563-2570, 2004.

NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H.; SAKAGUCHI, E. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 800-807, 2003.

O'KIELY, P.O.; CLANCY, M.; DOYLE, E.M. Aerobic stability of grass silage mixed with a range of concentrate feedstuffs at feed-out. In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 19., 2001. São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 794-795.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.C.; SPOELSTRA, S.F.; FABER, F.; DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2 propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied Environmental Microbiology**, Oxford, v. 67, p. 125–132, 2001.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 31-94.

PRYCE, J.D. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, Cambridge, v. 94, p. 1151-1152, 1969.

QUEIROZ, O.C.M.; ADESOGAN, A.T.; ARRIOLA, K.G.; QUEIROZ, M.F.S. 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, p. 3354–3362, 2012.

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

RANJIT, N.K.; TAYLOR, C.C.; KUNG Jr., L. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. **Grass Forage Science**, Oxford, v. 57, p. 73–81, 2002.

RUSSELL, J.R.; IRLBECK, N.A.; HALLAUER, A.R.; BUXTON, D.R. Nutritive value and ensiling characteristics of maize herbage as influenced by agronomic factors. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.38, p.11-24, 1992.

SANT'ANA, A.D.S.; AZEREDO, D.R.P. Comparação entre o sistema Petrifilm RSA® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 531-535, 2005.

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

SOUSA, G.B.; TAMAGNINI, L.M.; GONZALEZ, R.D.; BUDDE, C.E. Evaluation of Petrifilm method for enumerating aerobic bacteria in Crottin goat cheese. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 37, n. 4, p. 214-216, 2005.

STATISTICAL ANALYSIS SYTEM. **SAS User's guide: statistics**. version 9.1.3. Cary, 2003. 965 p.

TAYLOR, C.C.; KUNG Jr., L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 6, p. 1526-1532, 2002.

WARTH, A.D. Mechanism of resistance of *Saccharomyces baillii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 43, p. 215–230, 1977.

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

WEINBERG, Z.G.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; AZRIELI, A.; SZAKACS, G.; FILYA, I. Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 28, p. 7–11, 2002.

4 *Lactobacillus buchneri* EXCLUSIVO OU ASSOCIADO AO *Lactobacillus plantarum* EM SILAGENS DE FORRAGENS TROPICAIS

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de *L. buchneri* e/ou a combinação deste com *L. plantarum* sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e valor nutritivo de silagens de milho, cana-de-açúcar e capim-elefante cv. Napier. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Para a ensilagem da cultura do milho foram estabelecidos três tratamentos, totalizando 12 unidades experimentais. Com as culturas de cana-de-açúcar e capim, foram estabelecidos dois tratamentos, totalizando oito unidades experimentais para cada cultura. Os tratamentos utilizados no milho foram: Controle – silagem de milho sem adição de inoculante; LB – 1×10^5 ufc/g forragem fresca de *Lactobacillus buchneri*; LB+LP – 1×10^5 ufc/g forragem fresca de *Lactobacillus buchneri* e *Lactobacillus plantarum*. Na cultura da cana-de-açúcar os tratamentos foram: Controle e LB e no capim Napier foram utilizados os tratamentos Controle e LB+LP, em ambos os casos, nas mesmas doses usadas na silagem de milho. Os silos foram abertos após 150 dias de armazenamento. O tratamento das silagens de milho com *L. buchneri*, exclusivamente, ou associado com *L. plantarum* não afetou as variáveis relacionadas com o valor nutritivo das silagens. As concentrações de ácido acético nas silagens de milho foram superiores no tratamento controle. As demais variáveis fermentativas, microbiológicas, perdas e estabilidade aeróbia não diferiram. Nas silagens de cana-de-açúcar, o tratamento LB apresentou maiores teores de MS e DVIVMO, não sendo observadas diferenças para as demais variáveis de valor nutritivo. O tratamento controle apresentou maior população de bactérias ácido lácticas, e menor valor de pH. As concentrações de ácidos produzidos durante a fermentação não foi afetada pelo tratamento com *L. buchneri*. A silagem de cana-de-açúcar sem aditivo atingiu o pico de temperatura após o tratamento LB, sendo esse pico superior na silagem aditivada. Foram observadas menores perdas de matéria seca e produção de gases nas silagens aditivadas, resultando assim em maior recuperação de MS no tratamento LB. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos para produção de efluentes. Foi observado maior tempo para atingir a temperatura máxima e menor acúmulo de temperatura até o quinto dia de exposição aeróbia no tratamento controle. A temperatura máxima atingida durante a exposição aeróbia foi superior no tratamento LB. Nas silagens de capim, as silagens do tratamento LB+LP apresentaram maiores teores de MS, e menor teor de PB. As variáveis relativas à fibra, FDN, FDA e hemicelulose, não diferiram entre os tratamentos. Para as silagens de capim foi observada maior população de bactérias ácido lácticas nas silagens do tratamento LB+LP. As contagens de leveduras, assim como o pH e os teores de ácidos acético, butírico, propiônico e láctico não diferiram. A perda de MS e as variáveis analisadas durante a exposição aeróbia não diferiram entre os tratamentos. A inoculação com *L. buchneri*, exclusivo, ou em associação com *L. plantarum* não foi eficiente em melhorar o valor nutritivo e estabilidade aeróbia das forragens avaliadas.

Palavras-chave: Deterioração aeróbia; Controle de perdas

Abstract

The objective of this trial was to evaluate the effect of *L. buchneri* with or without *L. plantarum* on the fermentation profile, aerobic stability and nutritive value of corn, sugarcane and tropical grass silages. The experiment was carried out in a completely randomized design, with four replications. For the corn silage there were three treatments, totalizing 12 experimental units. For the sugarcane and tropical grass crops, there were established two treatments, totalizing eight experimental units for each crop. The treatments for corn were: Control – corn silage without additive; LB – 1×10^5 cfu/g fresh forage of *Lactobacillus buchneri*; LB+LP – 1×10^5 cfu/g fresh forage of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum*. For sugarcane the treatments were Control and LB, and for the tropical grass, Control and LB+LP, for both forage sources the same doses used for corn were adopted. The silos were opened after 150 days storage. Inoculation of corn silages with *L. buchneri*, alone or combined with *L. plantarum* did not affect the variables related to the silage nutritive value. Acetic acid content of corn silages was higher for the control treatment. The other fermentative parameters, microbiological profile, losses and aerobic stability variables did not differ. In sugarcane silages, LB treatment showed higher DM content and IVTOMD, with no difference for the other nutritive value variables. Control treatment showed higher lactic acid bacteria counts, and lower pH. The content of acids produced during fermentation was not affected by *L. buchneri* treatment. Sugarcane silage without additive reach temperature peak after LB treatment, with this peak being higher at the additivated silage. There were observed lower dry matter losses and gas production in LB silages, resulting in higher dry matter recovery. It was not observed difference among treatments for the effluent production. It was observed higher time to reach maximum temperature and lower temperature accumulation until fifth day of aerobic exposure for the control treatment. Maximum temperature reached during aerobic exposure was higher for LB treatment. In tropical grass silages, LB+LP silages showed higher DM and lower CP contents. NDF, ADF and hemicellulose did not differ among treatments. It was observed higher lactic acid bacteria in LB+LP treatment. Yeast counts, as well as pH and acetic, butyric, propionic and lactic acids content did not differ. Dry matter losses and the variables analyzed during aerobic exposure did not differ among treatments. Inoculation with *L. buchneri*, alone or combined with *L. plantarum* was not efficient in improving nutritive value and aerobic stability of evaluated forages.

Keywords: Aerobic deterioration; Losses control

4.1 Introdução

Durante o verão, a produção de forragens tropicais é elevada, principalmente em capins e cana-de-açúcar. No caso de capins tropicais, o alto teor de umidade e o baixo teor de carboidratos solúveis nestas forragens pode limitar o processo de ensilagem (NUSSIO, 2005), por permitir a ação de bactérias do gênero *Clostridium*, as quais convertem ácido láctico em ácido butírico, elevando o pH, além de reduzir o valor nutritivo da forragem pelo catabolismo de aminoácidos (McDONALD, HENDERSON; HERON, 1991)

O uso de aditivos microbianos compostos por bactérias homoláticas em silagens de capim-elefante cv. Napier reduziu os teores de nitrogênio amoniacal em até 27% e ácido butírico em até 31%, aumentou a recuperação de MS em cerca de 3% e a estabilidade aeróbia em 25% (RODRIGUES et al., 2003; ZANINE et al., 2007; FERREIRA et al., 2011).

O uso de combinações de bactérias homoláticas e heteroláticas tem sido estudado em silagens de milho, trigo, alfafa e capins a fim de aliar o efeito positivo da homoláticas na fermentação, com rápido abaixamento do pH pela elevada produção de ácido láctico e as vantagens das bactérias heteroláticas após a abertura, pela produção de ácido acético, eficiente no controle de fungos e leveduras (FILYA, 2003; HU et al., 2009; REICH; KUNG, 2010; ARRIOLA et al., 2011; QUEIROZ et al., 2012)

No Brasil, a produção de cana-de-açúcar é elevada e sua ensilagem representa alternativa ao processo de corte diário para fornecimento do material *in natura*. No entanto, ao se considerar a possibilidade de ensilagem da cana-de-açúcar deve-se levar em conta que estas apresentam fermentação tipicamente alcoólica, devido à intensa atividade de leveduras que convertem os açúcares da forragem a etanol, CO₂ e água. Teores de etanol na ordem de 8 a 17% da MS têm sido relatados para cana-de-açúcar ensilada sem o uso de aditivos, acompanhados por perdas gasosas de até 15,9% da MS (PEDROSO et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2007) e perdas totais de matéria seca de até 32,5% (KUNG Jr.; STANLEY, 1982; ANDRADE et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2007). Este tipo de fermentação pode causar reduções de 44 a 68% no teor de açúcares, aumento relativo nos componentes da parede celular e redução de 28% na digestibilidade da cana-de-açúcar assim conservada (ALLI; FAIRBARN; BAKER, 1983; PEDROSO et al., 2005).

O uso de inoculantes a base de bactérias heteroláticas têm sido eficiente em controlar a população de leveduras, reduzindo a fermentação alcoólica na massa ensilada, e melhorando a estabilidade aeróbia tanto em silagens de milho (RANJIT; TAYLOR; KUNG, 2002; NISHINO et al., 2004; KRISTENSEN et al., 2010; TABACCO et al., 2011), como de cana-de-açúcar (SIQUEIRA et al., 2007; ÁVILA et al., 2008; MENDES et al., 2008; MAEDA et al., 2011; ÁVILA et al., 2012). Silagens de cana-de-açúcar aditivadas com *L. buchneri* têm mostrado redução de 50% na produção de etanol (1,9 vs. 4,1% da MS), 17% na perda de gases, 56% na perda total de MS e aumento de 64% na estabilidade aeróbia em relação às silagens não aditivadas (PEDROSO et al., 2002, 2005; SIQUEIRA et al., 2007; MENDES et al., 2008).

Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de *L. buchneri* e/ou a combinação deste com *L. plantarum* sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e valor nutritivo de silagens de milho, cana-de-açúcar e capim-elefante cv. Napier.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Ensilagem e tratamentos

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ). A ensilagem foi realizada no dia 08/07/2011.

Para a ensilagem do milho foi utilizado o híbrido Pioneer 30F90 *Bt* e quando o mesmo atingiu média de 36,91% de matéria seca, 132 dias após sua emergência, procedeu-se a ensilagem (Tabela 26). As plantas foram colhidas mecanicamente com colhedora de forragem marca Mentamint®, tracionada por trator, regulada para corte com tamanho médio de partículas entre 5 a 10 mm.

O cultivar de cana-de-açúcar utilizado foi o IAC-93-3046, e a ensilagem foi realizada quando a maturação atingiu 21,4° Brix e 26,41% de matéria seca. As plantas foram colhidas mecanicamente com colhedora de cana-de-açúcar, tracionada por trator, regulada e afiada para corte com tamanho médio de partículas entre 5 e 10mm.

A espécie de capim utilizada foi capim elefante, cultivar Napier (*Pennisetum purpureum*, cv. Napier). As plantas foram colhidas manualmente com roçadeira costal e picadas em picadora estacionária regulada para corte com tamanho médio de partículas entre 5 e 10mm.

Como silos experimentais (unidades experimentais) foram utilizados baldes plásticos com capacidade de 20L com tampas próprias à vedação e adaptadas com válvulas do tipo Bunsen, para que fosse possível o escape de gases e a avaliação das perdas gasosas durante a ensilagem. Durante a ensilagem, os silos foram abastecidos em camadas de 10-15 cm e compactados por pisoteio humano até atingir densidade média de 600 kg/m³. No fundo de cada balde foram colocados dois quilos de areia seca, separados da massa de forragem por tela fina de plástico e duas camadas de tecido fino de algodão, com vista à avaliação quantitativa de efluentes. Após o enchimento, os silos foram fechados com as tampas apropriadas, identificados e pesados. Após a pesagem, as tampas foram vedadas com fita plástica autoadesiva, para impedimento da entrada de ar, e os silos experimentais foram mantidos em local protegido, sob temperatura ambiente, até o momento da abertura (JOBIM et al., 2007). A abertura foi realizada 150 dias após a ensilagem.

Para a imposição dos tratamentos foram utilizados os inoculantes produzidos pela empresa DeLaval[®]. Foram utilizados dois inoculantes, o primeiro era composto por bactérias da espécie *Lactobacillus buchneri* (DSM - 13573). O segundo inoculante utilizado era composto por bactérias da espécie *Lactobacillus buchneri* e *Lactobacillus plantarum* (DSM – 3676 e DSM – 3677). Os inoculantes foram diluídos em água destilada e pulverizados sobre as respectivas forragens. Em todos os tratamentos foi respeitada a adição de água destilada com uma concentração de 4 litros por tonelada de forragem fresca. Foram utilizadas as seguintes forragens com os seguintes tratamentos:

- Milho:

Controle – Silagem de milho sem adição de inoculante;

LB – Adição de 100.000 ufc/g forragem fresca de *Lactobacillus buchneri*;

LB+LP – Adição de 100.000 ufc/g forragem fresca composto de *Lactobacillus buchneri* e *Lactobacillus plantarum*;

- Cana-de-açúcar:

Controle – Silagem de cana-de-açúcar sem adição de inoculante;

LB – Adição de 100.000 ufc/g forragem fresca de *Lactobacillus buchneri*;

- Capim Elefante CV. Napier

Controle – Silagem de capim sem adição de inoculante;

LB+LP – Adição de 100.000 ufc/g forragem fresca de *Lactobacillus buchneri* e *Lactobacillus plantarum*;

4.2.2 Amostras e variáveis analisadas na forragem fresca

Durante a ensilagem, as forragens foram amostradas e divididas em três sub-amostras. A primeira sub-amostra foi pesada e seca em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas (AOAC, 1990). Após este período, as amostras foram pesadas novamente, moídas em moinhos tipo Wiley com peneira de malha 1mm, e armazenadas em potes de plástico. Com as amostras secas e moídas foi determinado o teor de matéria seca (MS) em estufa a 105°C durante 12 horas. O conteúdo de matéria mineral (MM) foi determinado após incineração das amostras em forno tipo mufla a 550°C, durante três horas (AOAC, 1990).

A determinação da composição bromatológica das forragens foi realizada utilizando-se o método de espectroscopia de reflectância de infravermelho proximal (NIRS) (BERZAGHI; COZZI; ANDRIGHETTO, 1997; COZZOLINO; ACOSTA; GARCIA, 2001). O material moído foi escaneado para obtenção dos espectros. O equipamento utilizado foi o espectrômetro modelo NIRS 5000 (NIRSystems®, Silver Spring, MD, USA) acoplado a microcomputador equipado com *software* WinISI II versão 6.2 (Intrasoft International, PA). As amostras foram escaneadas nesse equipamento obtendo leituras compreendidas entre os comprimentos de onda de 700 a 2100 nm. As amostras escaneadas geraram as seguintes variáveis para todas as forragens: fibra insolúvel em detergente ácido (FDA); fibra insolúvel em detergente neutro (FDN); proteína bruta (PB); digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS); digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica (DVIVMO). Para as amostras de capim também foram preditos os teores de hemicelulose. As amostras de milho geraram, além das variáveis já descritas, valores de: nitrogênio insolúvel no FDA (N-FDA), extrato etéreo (EE), celulose, lignina e amido.

A segunda sub-amostra foi utilizada nas avaliações microbiológicas, onde amostras de 25 g foram pesadas em sacos plásticos juntamente com 225 mL de solução salina (2,25g NaCl, 0,105g de KCl, 0,9g de CaCl₂ dihidratado e 0,05g de NaHCO₃) e homogeneizada durante quatro minutos em velocidade de 150 rpm mediante aparelho Lab-Blender Stomacher 400 (Steward Laboratory, London). A partir dos extratos diluídos e filtrados em gaze foram realizadas as demais diluições (10^{-2} a 10^{-6}) e o plaqueamento das diluições em placas com meio seletivo (Petrifilm 3M® AC e YM). Após o plaqueamento os filmes foram armazenados em incubadora (BOD) com temperatura controlada, sendo que os filmes para crescimento de

bactérias ácido lácticas foram incubados por 48 horas a 32°C e os filmes para crescimento de leveduras e fungos foram incubados por 72 e 120 horas, respectivamente, a 23°C. Os números de microrganismos presentes foram contados como unidade formadora de colônia e expressos como logaritmo na base 10.

As placas Petrifilm[®] são cartões de papel quadriculado revestido de polietileno recoberto com nutrientes desidratados e gel hidrossolúvel a frio, protegido por um filme plástico recoberto internamente pelo mesmo gel e corante indicador de trifeniltetrazólio (TCC) nas placas para crescimento de bactérias. Ao adicionar um mililitro da amostra os nutrientes se hidratam e o gel solidifica. Com o auxílio de um difusor específico, delimita-se a área de solidificação em 20cm² para placas de bactérias e 30cm² nas placas de leveduras e fungos. Após a solidificação de um minuto as placas estão prontas para serem incubadas. As bactérias reduzem o TCC por meio de enzimas, formando o composto formazano que fica acumulado no interior das células e se torna vermelho, facilitando assim as contagens (SANT'ANA; AZEREDO, 2005).

Utilizou-se placas Petrifilm[®] visando facilitar a condução das análises e diminuir as contaminações em placas convencionais, devido às dificuldades no preparo de meio de cultivo e maior exposição ao ambiente quando foram utilizados protocolos convencionais. A metodologia para contagem de bactérias e leveduras utilizando Petrifilm[®] não apresenta diferenças em relação à metodologia tradicional em placas e meio de cultivo líquido (KNIGHT et al., 1997; BEUCHAT et al., 1998; de SOUSA et al., 2005; SANT'ANA; AZEREDO, 2005).

4.2.3 Perdas de matéria seca durante o armazenamento

No momento da abertura, os silos foram pesados objetivando-se avaliar o efeito dos tratamentos quanto às perdas de matéria seca total, produção de gases e produção de efluente. Para que fosse possível a determinação das perdas, o conjunto vazio (balde + areia + tampa + tela + pano) foi pesado antes da ensilagem e, imediatamente, após a abertura. Seguindo o mesmo procedimento, esse conjunto, contendo a forragem, também foi pesado nesses mesmos dois momentos (JOBIM et al., 2007).

A produção de efluentes foi calculada pela diferença entre o peso do conjunto sem forragem após a abertura e o peso do conjunto antes da ensilagem, em relação à quantidade de forragem ensilada, expressa em kg/t de MV:

$$PE = \frac{(Pab - Pen) \times 1000}{(MVen)} \quad (1)$$

Onde:

PE = produção de efluente (kg/t de MV);

Pab = peso do conjunto vazio (balde+areia+tampa+pano) no momento da abertura (kg);

Pen = peso do conjunto vazio (balde+areia+tampa+pano) no momento da ensilagem (kg);

MVen = quantidade de massa verde inicialmente ensilada (kg);

As perdas gasosas foram calculadas pela diferença de pesos dos silos na ensilagem e na abertura, em relação à massa de forragem armazenada. Para esses cálculos foram descontadas as taras dos silos, e os valores expressos em % da MS (SCHMIDT, 2006):

$$PG = \frac{[(PCen - Pen) \times MSen] - [(PCab - Pen) \times MSab] \times 100}{[(PCen - Pen) \times MSen]} \quad (2)$$

Onde:

PG = perda por gases (% da MS);

PCen = peso do balde cheio no momento da ensilagem (kg);

Pen = peso do conjunto vazio (balde+areia+tampa+pano) no momento da ensilagem (kg);

MSen = teor de matéria seca da forragem na ensilagem (%);

PCab = peso do balde cheio no momento da abertura (kg);

MSab = teor de matéria seca da forragem na abertura (%);

A perda total de matéria seca foi calculada pela diferença entre o peso de matéria seca no momento da ensilagem e peso de matéria seca no momento da abertura, em relação à quantidade de matéria seca ensilada (Equação 3). Com base na equação descrita por Schmidt (2006) foram estimadas as perdas totais de matéria seca, expressas em %:

$$PMS = \frac{[(PCen - Pen) \times MSen] - [(PCab - Pab) \times MSab] \times 100}{[(PCen - Pen) \times MSen]} \quad (3)$$

Onde:

PMS = perda total de matéria seca (%);

PCen = peso do balde cheio no momento da ensilagem (kg);

Pen = peso do conjunto vazio (balde+areia+pano+tela) no momento da ensilagem (kg);

MSen = teor de matéria seca da forragem na ensilagem (%);

PCab = peso do balde cheio na abertura (kg);

Pab = peso do conjunto vazio (balde+areia+pano+tela) no momento da abertura (kg);

MSab = teor de matéria seca da forragem na abertura (%);

4.2.4 Amostragens e variáveis analisadas na silagem

Durante a abertura dos silos a silagem foi coletada e dividida em quatro amostras. A primeira sub-amostra foi utilizada para preparo do extrato aquoso, onde uma alíquota de 25 g de amostra foi pesada em saco plástico e diluída em 225 mL de água deionizada, seguida de homogeneização durante quatro minutos com velocidade de 150 rpm em aparelho Lab-Blender Stomacher 400 (Steward Laboratory, London). Os extratos foram armazenados em tubos tipo eppendorf em freezer (-20°C) para futuras análises de ácidos graxos voláteis e ácido láctico.

Para análise dos ácidos graxos voláteis (ácido acético e ácido butírico), 800 µL do extrato aquoso da silagem, juntamente com 200 µL de ácido fórmico e 100 µL de padrão interno foram transferidos para um frasco de vidro. A leitura foi realizada em cromatógrafo líquido gasoso, CLG (Hewlett Packard® 5890, series II). A determinação da concentração de ácido láctico foi realizada por meio da adaptação do método espectrofotométrico (565 nm) de Pryce (1969). O aumento das concentrações da curva padrão, 10 vezes maior do que a sugerida, foi necessária devido à elevada concentração de ácido láctico proveniente de silagem, frente ao tipo de amostra utilizada na metodologia original (plasma sanguíneo e urina).

A demais sub-amostras foram utilizadas para as análises já descritas no item 4.2.2.

4.2.5 Características da forragem no momento da ensilagem

Neste item serão apresentados os valores da composição bromatológica das forragens utilizadas.

4.2.5.1 Milho

Na Tabela 26 estão apresentados os valores relativos à cultura do milho no momento da ensilagem, sem comparações estatísticas, apenas para caracterização da forragem.

As forragens apresentaram teor médio de matéria seca de 37,6%. As concentrações de FDN variaram de 49,1% no tratamento controle até 52,3% no tratamento LB+LP.

No momento da ensilagem foi verificada a presença de leveduras com população média de 6,65 log ufc/g e população média de fungos de 5,76 log ufc/g forragem. A forragem do tratamento LB+LP apresentou população superior de bactérias ácido lácticas, com diferença de 2 log ufc/g de forragem fresca.

Tabela 26 - Características da forragem de milho no momento da ensilagem

Variável ¹	Controle	LB	LB+LP
MS, %	37,02	39,01	36,70
MM, % MS	4,10	3,60	4,71
PB, % MS	6,87	6,57	6,90
EE, % MS	1,97	2,12	1,92
FDN, % MS	49,09	50,21	52,28
FDA, % MS	29,69	28,88	30,86
CEL, % MS	23,22	23,47	24,69
HEMI, % MS	21,95	23,41	23,51
LIG, % MS	2,97	1,27	2,04
Amido, % MS	29,64	29,01	28,41
NFDA, % N total	8,54	8,69	8,74
DVIVMS, %	75,36	74,35	74,76
DVIVMO, %	74,00	72,86	73,44
BAL, log ufc/g	7,46	7,17	9,46
LEV, log ufc/g	6,74	6,45	6,77
Fungo, log ufc/g	5,66	5,74	5,88

¹BAL: bactéria ácido láctica; LEV: levedura; MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; NFDA: nitrogênio indisponível; CEL: celulose; HEMI: hemicelulose; LIG: lignina; EE: extrato etéreo; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; DVIVMO: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica

4.2.5.2 Cana-de-açúcar

Na Tabela 27 estão apresentados os valores relativos à cultura da cana-de-açúcar no momento da ensilagem, sem comparações estatísticas, apenas para caracterização da forragem.

No momento da ensilagem a forragem apresentou 21,4° Brix e teor de matéria seca de 26,41%, 3,10% de proteína e 64,7% de FDN.

A população epifítica encontrada na cana-de-açúcar foi de 5,24 log ufc/g para leveduras e 5,22 log ufc/g forragem fresca de fungos. A população de bactérias ácido lácticas, mensurada após inoculação na forragem, foi de 6,23 log ufc/g para a forragem inoculada, enquanto na forragem do tratamento controle foi de 6,11 log ufc/g forragem fresca.

Tabela 27- Valor nutritivo da cana-de-açúcar no momento da ensilagem

Variável ¹	Controle	LB
MS, %	26,33	26,50
MM, % MS	5,45	5,10
PB, % MS	3,08	3,11
FDN, % MS	63,54	62,86
FDA, % MS	42,54	42,52
DVIVMS, %	56,00	56,50
DVIVMO, %	54,46	55,06
BAL, log ufc/g	6,11	6,23
LEV, log ufc/g	5,28	5,20
Fungo, log ufc/g	5,15	5,30

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; DVIVMO: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica; BAL: bactéria ácido láctica; LEV: levedura

4.2.5.3 Capim

No momento da ensilagem o capim utilizado apresentou 19,33% de matéria seca e 15,15% MS de matéria mineral. Os teores de proteína bruta observados variaram de 18,23 a 18,47% MS. As concentrações de fibra foram de 63,6% de FDN e 36,23 % de FDA.

As forragens inoculadas apresentaram população de BAL em média de 7,38 log ufc/g forragem fresca e as forragens do tratamento controle 7,27 log ufc/g forragem fresca. As forragens utilizadas apresentaram população média de leveduras de 6,30 log ufc/g forragem e população de fungo filamentosos de 6,57 ufc/g forragem.

Tabela 28 - Valor nutritivo do capim no momento da ensilagem

Variável ¹	Controle	LP+LB
MS, %	18,80	19,87
MM, % MS	14,70	15,60
PB, % MS	18,47	18,23
FDN, % MS	63,44	63,76
FDA, % MS	36,21	36,26
HEMI, % MS	25,76	25,81
DVIVMS, %	68,96	69,65
DVIVMO, %	62,38	62,21
BAL, log ufc/g	7,27	7,38
LEV, log ufc/g	6,23	6,38
Fungo, log ufc/g	6,51	6,64

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; HEMI: hemicelulose; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; DVIVMO: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica; BAL: bactérias ácido lácticas; LEV: leveduras

4.2.6 Estabilidade aeróbia das silagens

Após a abertura dos silos, aproximadamente 4 kg de silagem foram acomodados, sem compactação, em baldes de plástico sem tampa com capacidade de 20 litros cada, os quais foram mantidos em ambiente protegido, com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por um período de 240 horas (10 dias). No centro geométrico do balde foi acondicionado sensor de temperatura associado a um sistema informatizado e eletrônico de aquisição de dados (Chiplog[®], IMPAC, USA) programado para leitura da temperatura da massa em intervalos constantes de 15 minutos.

Para a determinação da estabilidade aeróbia foram estudadas as seguintes variáveis: T_{máx}: temperatura máxima alcançada ($^{\circ}\text{C}$); TT_{máx}: tempo para alcançar a temperatura máxima (horas); Perda de estabilidade: tempo, em horas, necessário para a temperatura da silagem atingir 2°C acima da temperatura ambiente; AC5: acúmulo de temperatura da amostra em relação à temperatura ambiente durante cinco dias de exposição aeróbia ($^{\circ}\text{C}$) e AC10: acúmulo de temperatura da amostra em relação à temperatura ambiente durante dez dias de exposição aeróbia ($^{\circ}\text{C}$) (O'KIELY; CLANCY; DOYLE, 2001).

4.2.7 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Para a ensilagem da cultura do milho foram estabelecidos três

tratamentos, totalizando assim, 12 unidades experimentais. Com as culturas de cana-de-açúcar e capim, foram estabelecidos dois tratamentos, totalizando oito unidades experimentais para cada cultura.

Os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias foram comparadas separadamente entre cada cultura pelo teste de Tukey com probabilidade de 5%, utilizando-se o procedimento MIXED do programa SAS (2003).

4.3 Resultados

Neste item as variáveis estudadas estão apenas descritas, e as comparações e discussões estão apresentadas no item 4.4.

4.3.1 Silagem de milho

4.3.1.1 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos

Na Tabela 29 estão apresentados os valores das entidades bromatológicas analisadas após a abertura dos silos. O tratamento das silagens com *L. buchneri*, exclusivamente, ou associado com *L. plantarum* não afetou ($P>0,05$) as variáveis relacionadas com o valor nutritivo das silagens após 150 dias de armazenamento. A matéria seca média reduziu após a estocagem, de 37,6% durante a ensilagem para 35,57% após a abertura.

Tabela 29 - Valor nutritivo de silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* e *L. plantarum* no momento da abertura dos silos

Variável ¹	Controle	LB	LB+LP	EPM ²	Efeito ³
MS, %	34,87	36,71	35,12	0,96	NS
MM, % MS	4,04	4,39	4,52	0,21	NS
EE, % MS	2,23	2,37	2,29	0,12	NS
PB, % MS	7,35	7,16	7,66	0,16	NS
FDN, % MS	53,40	51,90	50,37	0,90	NS
FDA, % MS	35,01	33,99	33,38	0,65	NS
CEL, % MS	27,64	26,58	25,97	0,61	NS
HEMI, % MS	20,39	20,14	18,85	0,49	NS
LIG, % MS	5,57	5,84	5,67	0,23	NS
Amido, % MS	23,81	25,96	26,42	1,17	NS
NFDA, % N total	6,21	6,30	5,68	0,13	NS
DVIVMS, %	70,67	71,26	71,68	0,61	NS
DVIVMO, %	69,33	69,85	70,27	0,69	NS

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; EE: extrato etéreo; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; CEL: celulose; HEMI: hemicelulose; LIG: lignina; NFDA: nitrogênio insolúvel no FDA; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; DVIVMO: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica; ²EPM: erro padrão da média; ³NS: não significativo

4.3.1.2 Características fermentativas e microbiológicas das silagens

Na Tabela 30 estão apresentados os valores das variáveis fermentativas e microbiológicas analisadas após a abertura dos silos experimentais.

A população de BAL foi numericamente superior nas forragens aditivadas, 6,23; 5,65; e 5,32 log ufc/g de silagem nos tratamentos LB+LP, LB e controle, respectivamente, entretanto não foram detectadas diferenças estatísticas ($P>0,05$). As contagens de leveduras foram em média de 4,77 log ufc/g de silagem e não foram detectados fungos nas amostras devido às diluições utilizadas. A população de fungos foi inferior a 3 log ufc/g.

Os valores de pH variaram de 3,70 no tratamento LB+LP até 3,79 no tratamento LB. As concentrações de ácido acético foram superiores ($P<0,05$) no tratamento controle (2,30% MS) em relação ao tratamento LB (1,23% MS). O tratamento LB+LP apresentou teor intermediário, 1,50% MS, não diferindo ($P>0,05$) dos demais tratamentos. Foram observadas baixas concentrações de ácido butírico nas silagens, não ultrapassando 0,10% MS.

Tabela 30 - Características fermentativas e microbiológicas das silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* e *L. plantarum*

Variável ¹	Controle	LB	LB+LP	EPM ²	Efeito ³
BAL, log ufc/g	5,32	5,65	6,23	0,27	NS
Levedura, log ufc/g	4,63	4,84	4,83	0,09	NS
pH	3,76	3,79	3,70	0,04	NS
Ácido acético, % MS	2,30 ^a	1,23 ^b	1,50 ^{ab}	0,26	*
Ácido butírico, % MS	0,10	0,04	0,05	0,02	NS
Ácido láctico, % MS	2,62	4,60	4,46	0,84	NS

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si estatisticamente ($P<0,05$) pelo teste de Tukey; ¹BAL: bactérias ácido lácticas; ²EPM: erro padrão da média; ³NS: não significativo; ** $P<0,001$; * $P<0,05$

4.3.1.3 Perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens

Observando a Figura 14 verificou-se que as silagens apresentaram comportamento muito semelhante durante o período de exposição aeróbia. Todos os tratamentos iniciaram o aquecimento após 48 horas e atingiram o pico de temperatura após o quinto dia de exposição.

Figura 14 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbia de silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* e *L. plantarum*

Na Tabela 31 estão apresentados os valores e comparações estatísticas referentes às características de perda na abertura e variáveis analisadas durante o período de exposição aeróbia. As perdas observadas foram inferiores no tratamento LB+LP, porém sem diferença estatística ($P > 0,05$). Essas perdas ocorreram devido à produção de gases durante o armazenamento, não tendo sido detectada produção de efluente nessas silagens.

Com relação às variáveis analisadas durante a exposição aeróbia, os tratamentos não diferiram ($P > 0,05$). As temperaturas máximas alcançadas foram de 37,8; 36,4 e 36,2°C nos tratamentos controle, LB+LP e LB, respectivamente. Todas as silagens ultrapassaram a temperatura ambiente em dois graus Celsius após 60 horas de exposição aeróbia.

Tabela 31 - Perdas de matéria seca e variáveis analisadas durante a exposição aeróbia de silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* e *L. plantarum*

Variável ¹	Controle	LB	LB+LP	EPM ²	Efeito ³
Perda MS, %	6,83	6,73	3,92	1,46	NS
RMS, %	93,17	93,27	96,08	1,46	NS
Gases, % MS	6,83	6,73	3,92	1,46	NS
Temperatura Max, °C	37,87	36,23	36,40	1,01	NS
Tempo Máx, horas	144,17	161,92	142,33	10,57	NS
Perda de estabilidade, horas	65,25	66,68	60,50	3,34	NS
AC5, °C	16,57	16,76	20,13	2,26	NS
AC10, °C	72,21	70,38	74,13	6,50	NS

¹RMS: recuperação de matéria seca; MS: matéria seca; AC5: acúmulo de temperatura durante cinco dias; AC10: acúmulo de temperatura durante dez dias; ²EPM: erro padrão da média; ³NS: não significativo

4.3.2 Silagem de cana-de-açúcar

4.3.2.1 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos

As silagens dos dois tratamentos apresentaram, em relação à forragem fresca, maiores valores de FDA, FDN e PB (Tabela 32). O efeito inverso ocorreu nos teores de MS, que apresentaram menores valores em relação à forragem fresca.

As silagens do tratamento LB apresentaram maiores ($P < 0,01$) teores de MS em relação ao controle. A DVIVMO foi maior ($P < 0,05$) nas silagens aditivadas. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para as variáveis, MM, PB, FDN, FDA e DVIVMS.

Tabela 32 - Valor nutritivo de silagens de cana-de-açúcar inoculadas com *L. buchneri* no momento da abertura dos silos

Variável ¹	Controle	LB	EPM ²	P
MS, %	22,34	23,70	0,20	0,002
MM, % MS	7,22	7,01	0,21	0,510
PB, % MS	3,55	3,47	0,06	0,330
FDN, % MS	71,47	70,75	0,81	0,550
FDA, % MS	49,91	49,19	0,49	0,338
DVIVMS, %	45,97	46,26	0,38	0,599
DVIVMO, %	45,49	46,63	0,25	0,017

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; DVIVMO: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica; ²EPM: erro padrão da média

4.3.2.2 Características fermentativas e microbiológicas das silagens

Na Tabela 33 estão apresentados os valores referentes às características fermentativas e microbiológicas das silagens. Após 150 dias de armazenamento, a silagem de cana-de-açúcar do tratamento controle apresentou maior ($P < 0,001$) população de bactérias ácido lácticas em relação ao tratamento LB (6,96 e 6,39 log ufc/g, respectivamente). Foi observado menor ($P < 0,05$) valor de pH nas silagens do tratamento controle. As concentrações de ácidos produzidos durante a fermentação não foram afetadas pelo tratamento com *L. buchneri*. As silagens apresentaram teores médios de ácido acético de 5,5% MS. A produção de ácido láctico foi ligeiramente superior no tratamento controle, porém sem diferença estatística.

Tabela 33 - Características fermentativas e microbiológicas de silagens de cana-de-açúcar inoculadas com *L. buchneri*

Variável ¹	Controle	LB	EPM ²	P
BAL, log ufc/g	6,96	6,36	0,06	<0,001
Levedura, log ufc/g	2,47	2,77	0,34	0,560
pH	3,43	3,56	0,03	0,009
Ácido acético, % MS	5,70	5,30	0,48	0,576
Ácido butírico, % MS	0,09	0,02	0,02	0,065
Ácido láctico, % MS	6,07	4,52	0,56	0,100

¹BAL: bactérias ácido lácticas; ²EPM: erro padrão da média;

4.3.2.3 Perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens

Na Figura 15 está apresentada a evolução temporal da temperatura das silagens durante dez dias de exposição aeróbia. Foi observado que o tratamento controle atingiu o pico de temperatura após o tratamento LB, sendo esse pico superior na silagem aditivada.

Figura 15 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbia de silagens de cana-de-açúcar tratadas com *L. buchneri* após 150 de armazenamento

Na Tabela 34 estão apresentados os valores relativos às perdas de matéria seca e variáveis analisadas durante a exposição aeróbia. Com relação às perdas de matéria seca, as silagens do tratamento LB foram superiores às silagens do tratamento controle. Foram observadas menores ($P < 0,01$) perdas de matéria seca e produção de gases nas silagens aditivadas, resultando assim em maior ($P < 0,01$) recuperação de MS no tratamento LB. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos na produção de efluentes.

Entretanto, com relação às variáveis mensuradas durante a exposição aeróbia, as silagens do tratamento controle foram superiores. Foi observado maior ($P < 0,05$) tempo para atingir a temperatura máxima e menor ($P < 0,05$) acúmulo de temperatura até o quinto dia de exposição aeróbia no tratamento controle. A temperatura máxima atingida durante a exposição aeróbia foi superior ($P < 0,05$) no tratamento LB.

Tabela 34 - Perdas de matéria seca e variáveis analisadas durante a exposição aeróbia de silagens de cana-de-açúcar inoculadas com *L. buchneri*

Variável ¹	Controle	LB	EPM	P
Perda MS, %	20,28	15,89	0,79	0,008
RMS, %	79,71	84,11	0,79	0,008
Gases, % MS	17,53	12,46	0,77	0,003
Efluente, kg/t MV	32,35	38,39	2,43	0,130
Temperatura Máx, °C	39,30	41,00	0,39	0,026
Tempo Máx, horas	137,12	94,67	6,53	0,006
Perda de estabilidade, horas	68,25	57,92	3,04	0,061
AC5, °C	23,20	35,00	2,77	0,029
AC10, °C	70,30	70,00	2,33	0,935

¹RMS: recuperação de matéria seca; ¹MS: matéria seca; AC5: acúmulo de temperatura durante cinco dias; AC10: acúmulo de temperatura durante dez dias

4.3.3 Silagem de capim elefante cv. Napier

4.3.3.1 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos

Na Tabela 35 estão apresentados os valores referentes ao valor nutritivo das silagens de capim elefante cv. Napier. As silagens do tratamento LB+LP apresentaram maiores ($P<0,05$) teores de MS quando comparadas ao tratamento controle (18,8 vs. 17,4%, respectivamente). A concentração de proteína bruta foi menor ($P<0,05$) no tratamento LP+LB. As variáveis relativas à fibra, FDN, FDA e hemicelulose, não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos. Com relação à composição bromatológica das forragens no momento da ensilagem, foi observado aumento nos teores de fibra, FDN e FDA. Durante a ensilagem os teores foram de 63,5 e 36,2% MS e aumentaram até 72,8 e 44,4, respectivamente. Durante a ensilagem os teores de proteína bruta foram de 18,35% MS e após o armazenamento das silagens esses valores decresceram até 14,1% MS.

Tabela 35 - Valor nutritivo de silagens de capim elefante cv. Napier no momento da abertura dos silos

Variável ¹	Controle	LP+LB	EPM	P
MS, %	17,4	18,8	0,21	0,004
MM, % MS	17,3	18,6	0,48	0,099
PB, % MS	14,8	14,1	0,19	0,026
FDN, % MS	72,4	73,3	0,35	0,096
FDA, % MS	44,1	44,8	0,23	0,076
HEMI, % MS	23,9	24,4	0,14	0,054
DVIVMS, %	62,9	62,0	0,37	0,148
DVIVMO, %	55,3	54,4	0,31	0,092

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; HEMI: hemicelulose; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; DVIVMO: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica;

³EPM: erro padrão da média

4.3.3.2 Características fermentativas e microbiológicas das silagens

Foi observada maior ($P < 0,001$) população de bactérias ácido lácticas nas silagens do tratamento LB+LP (Tabela 36). As contagens de leveduras não diferiram, com valor médio de 2,38 log ufc/g silagem.

Com relação às características fermentativas, foram observados valores de pH de 5,32 no tratamento LB+LP e 5,42 no tratamento controle. Altas concentrações de ácido butírico foram observadas em ambos os tratamentos, 2,5 e 2,8% MS nos tratamentos controle e LB+LP, respectivamente. O tratamento controle apresentou maior concentração de ácido láctico, 2,67 vs. 0,14% MS, entretanto, devido ao alto erro padrão da média, não foram detectadas diferenças estatísticas.

Tabela 36 - Características fermentativas e microbiológicas de silagens de capim elefante cv. Napier tratadas com *L. buchneri* e *L. plantarum*

Variável ¹	Controle	LB+LP	EPM	P
BAL, log ufc/g	6,81	7,71	0,07	<0,001
Levedura, log ufc/g	2,24	2,53	0,16	0,275
pH	5,42	5,32	0,06	0,315
Ácido acético, % MS	6,85	5,92	0,54	0,279
Ácido butírico, % MS	2,50	2,80	0,11	0,184
Ácido propiônico, % MS	0,50	0,70	0,10	0,277
Ácido láctico, % MS	2,67	0,14	1,04	0,137

¹BAL: bactérias ácido lácticas; ²EPM: erro padrão da média;

4.3.3.3 Perdas de matéria seca e estabilidade aeróbia das silagens

Na Figura 16 está apresentada a evolução temporal das temperaturas durante os dez dias de exposição aeróbia. As silagens do tratamento controle não

apresentaram incremento calórico durante o período, enquanto as silagens tratamento LB+LP aqueceram após o primeiro dia de exposição.

Figura 16 - Variação temporal da temperatura durante exposição aeróbia de silagens de capim elefante cv. Napier tratadas com *L. buchneri* e *L. plantarum* após 150 dias de armazenamento

Na Tabela 37 estão apresentados os valores de perdas e variáveis mensuradas durante a exposição aeróbia. A perda de matéria seca não apresentou diferença estatística, entretanto, pôde-se observar valores inferiores no tratamento LB+LP, sendo estes reflexo de dois fatores, primeiramente das menores perdas por gases e também devido à menor produção de efluentes. Durante a exposição aeróbia foi verificado que as silagens do tratamento controle não aqueceram. Variáveis como temperatura máxima não ultrapassaram 24°C e o acúmulo de temperatura durante os 10 dias de exposição aeróbia foi negativo.

Tabela 37 - Perdas de matéria seca e variáveis analisadas durante a exposição aeróbia de silagens de capim elefante cv. Napier tratadas com *L. buchneri* e *L. plantarum*

Variável ¹	Controle	LB+LP	EPM	P
Perda MS, %	11,58	9,74	1,11	0,287
RMS, %	88,42	90,26	1,11	0,287
Gases, % MS	8,75	7,15	1,06	0,328
Efluente, kg/T MV	30,52	27,41	1,16	0,108
Temperatura Max, °C	23,93	29,50	3,22	0,266
Tempo Máx, horas	1,75	10,69	6,87	0,393
Perda de estabilidade, horas	1,40	7,31	4,27	0,373
AC5, °C	-4,42	6,35	5,28	0,199
AC10, °C	-9,06	11,68	11,19	0,238

¹RMS: recuperação de matéria seca; MS: matéria seca; AC5: acúmulo de temperatura durante cinco dias; AC10: acúmulo de temperatura durante dez dias

4.4 Discussão

4.4.1 Silagem de milho

Durante a ensilagem a população de bactérias ácido lácticas no tratamento controle foi de 7,46 log ufc/g enquanto que a contagem no tratamento LB, após adição do aditivo, foi de apenas 7,17 log ufc/g. Era esperado que as contagens de BAL se elevassem após aplicação do aditivo, fato esse, que ocorreu no tratamento LB+LP, onde a população de BAL passou para 9,46 log ufc/g (Tabela 26).

Muck (2004) avaliou silagens de milho produzidas durante três anos consecutivos, utilizando três diferentes aditivos contendo exclusivamente *L. buchneri*. Os resultados encontrados neste estudo não foram consistentes em todos aditivos, sendo uma cepa utilizada ineficiente. Segundo o autor, o *L. buchneri* não é efetivo em melhorar a estabilidade aeróbia quando a diferença entre a população epífita de bactérias ácido lácticas e a dose de inoculante utilizada for menor que 1,5 log ufc/g. Diante disso, os dados observados neste experimento corroboram com o observado por Muck (2004), não havendo efeito do tratamento LB nas variáveis analisadas. Entretanto, não há explicação razoável para justificar contagem inferior à esperada no tratamento LB.

Com relação à produção de ácidos durante a fase fermentativa, as silagens do tratamento controle apresentaram maiores concentrações de ácido acético quando comparadas ao tratamento LB (2,3 vs. 1,23% MS), enquanto as silagens do tratamento LB+LP tiveram valores intermediários, de 1,50% MS. Esses resultados são contrários à expectativa dos aditivos utilizados. *L. buchneri* caracteriza-se por

apresentar rota metabólica heterolática, com capacidade de produzir ácido acético durante a fermentação e após a abertura do silo, com conseqüente controle efetivo de leveduras e fungos filamentosos (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999; DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; VAN WIKSELAAR; 1999; KUNG; RANJIT, 2001; FILYA, 2001, 2003; FILYA; KARABULUT; SUCU, 2002; RANJIT; TAYLOR; KUNG; 2002; WEINBERG et al., 2002; PAHLOW et al., 2003).

Filya (2003) em estudo com de silagens de milho com 21,5% de matéria seca, armazenadas por 90 dias, observou que as silagens tratadas com *L. buchneri* apresentavam maiores teores de ácido acético e menores concentrações de ácido láctico, enquanto as silagens que continham *L. buchneri* e *L. plantarum* apresentavam maiores teores de ácido láctico e de ácido acético, quando comparados ao tratamento controle. Esses aditivos foram efetivos em manter a silagem estável durante o período de exposição aeróbia.

Provavelmente, a falta de respostas positivas observadas no presente estudo pode estar relacionada com o alto teor de matéria seca das plantas de milho utilizadas (37,6%), que também resultou na ausência de efluentes.

Hu et al. (2009) avaliaram a influência dos teores de matéria seca, comparando silagens com teores de matéria seca de 33,1 e 40,6% após 240 dias de armazenamento. Com o aumento dos teores de matéria seca, houve acréscimo nos valores de pH, nas concentrações de etanol e nas contagens de leveduras de todos tratamentos. Os maiores teores de matéria seca influenciaram negativamente a eficácia dos aditivos. *L. plantarum* produziu menores concentrações de ácido láctico e sua combinação com *L. buchneri* também diminuiu as concentrações de ácidos produzidos.

Segundo Mcdonald; Henderson; Heron (1991), plantas ensiladas com teores de MS entre 25 e 30% apresentam produção reduzida de efluente. Nishino et al. (2004), avaliando silagens inoculadas com *L. buchneri* e com 29,1% de matéria seca não observaram diferenças entre os tratamentos controle e aditivo nas perdas de matéria seca durante 60 e 90 dias de armazenamento. As perdas foram de 3,81 e 4,52% na abertura com 60 dias e 4,51 e 8,08% na abertura com 90 dias para os tratamentos controle e aditivo, respectivamente. Valores semelhantes foram encontrados no presente estudo, onde as perdas de matéria seca foram de 6,8; 6,7 e 3,9% para os tratamentos controle, LB e LB+LP, respectivamente.

Durante a fase de exposição aeróbia das silagens a estabilidade foi mantida até 63 horas em média, e as silagens tiveram picos de temperatura de 36,3°C, os quais ocorreram após 144, 161 e 142 horas nos tratamentos controle, LB e LB+LP, respectivamente. Essas variáveis corroboram com silagens típicas de milho com teores de ácidos presentes. Resultados semelhantes foram encontrados por Tabacco et al. (2011) em silagens de milho do tratamento controle, com 34% de matéria seca, onde foi possível observar 64 horas para perda da estabilidade e 198 horas para atingir a temperatura máxima durante o período de exposição aeróbia.

Hu et al. (2009), avaliando a inoculação de *L. buchneri*, de forma exclusiva ou combinada com *L. plantarum*, observaram maior produção de ácido acético nas silagens inoculadas. Devido a isso, essas silagens foram mais estáveis durante a fase de exposição aeróbia.

4.4.2 Silagem de cana-de-açúcar

No momento da abertura dos silos observou-se redução nos teores de matéria seca em relação à forragem fresca, com reduções de 15% no tratamento controle, e de 10% nas silagens do tratamento LB. Devido a essas reduções nos teores de matéria seca, quando foram comparadas as concentrações das demais entidades bromatológicas, durante a ensilagem e no momento da abertura dos silos, observou-se acréscimo nas concentrações de MM, PB, FDN e FDA. Do mesmo modo, esses resultados foram relatados por Freitas et al. (2006), Pedroso et al. (2005) e Souza et al. (2008). Em silagens, a fração fibrosa pode aumentar percentualmente na MS devido à produção de efluentes, uma vez que os componentes solúveis em água são perdidos proporcionalmente ao aumento na fração menos fermentável e insolúvel, particularmente os constituintes da parede celular (VAN SOEST, 1992) que ficam retidos na silagem.

As silagens do tratamento controle apresentaram menores ($P < 0,05$) valores de pH (Tabela 33), e também foi observada tendência de maiores concentrações de ácido butírico e láctico nessas silagens. Schmidt et al. (2007) também observaram maiores valores de pH nas silagens tratadas com $3,6 \times 10^5$ ufc/g de *L. buchneri* em relação à silagem controle, após 90 dias de armazenamento, (3,46 vs. 3,31, respectivamente). No presente estudo foram observados valores de pH semelhantes, 3,56 no tratamento LB e 3,43 no tratamento controle.

Não foram detectadas diferenças na produção de ácido acético entre os tratamentos, sendo que a silagem controle também apresentou altas concentrações, de 5,7% MS. Pedroso et al. (2011), avaliando a produção de ácido acético em silagens de cana-de-açúcar aditivadas com *L. buchneri*, também não encontraram diferenças entre tratamentos, com valores de 6,75% MS no tratamento controle e 8,51% MS nas silagens tratadas com 5×10^4 ufc/g de *L. buchneri*. No mesmo sentido, Carvalho et al. (2012) observaram teor de ácido acético de 5,10% MS nas silagens de cana-de-açúcar do tratamento controle, após 170 dias de armazenamento.

Provavelmente, devido às concentrações de ácido acético nos tratamentos controle e LB, não foram detectadas diferenças na população de leveduras, que apresentaram contagem média de 2,62 log ufc/g de silagem.

Carvalho et al. (2012) também encontraram população de BAL de 7,72 log ufc/g nas silagens controle, enquanto as silagens tratadas com *L. buchneri* apresentaram 6,9 log ufc/g de forragem. Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com esses autores, uma vez que a população de BAL no tratamento controle foi superior (Tabela 33) ao tratamento LB (6,96 vs. 6,36 log ufc/g, respectivamente). Essa população de BAL encontrada no tratamento controle desses experimentos provavelmente corresponde à cepas de *Lactobacillus buchneri*. Ávila et al. (2009), prospectando bactérias ácido lácticas em silagens de cana-de-açúcar encontraram populações indígenas de *Lactobacillus buchneri* nessas silagens. Após isolamento dessas bactérias e inoculação em silagens de cana-de-açúcar, percebeu-se que essas populações foram tão efetivas na produção de ácido acético quanto as populações provenientes do aditivo comercial.

As silagens do tratamento controle apresentaram maiores ($P < 0,05$) perdas de matéria seca (20,3 vs. 15,9%), sendo estas influenciadas, principalmente, pela produção de gases, a qual também foi superior ($P < 0,05$) nesse tratamento (17,5 vs. 12,5). Siqueira et al. (2010), estudando o efeito de 5×10^4 ufc/g de *L. buchneri* em silagens de cana-de-açúcar com 35,3% MS, também observaram maiores produções de gases e perda de matéria seca no tratamento controle (17,0 vs. 12,2% MS e 31,0 vs. 16,0%, respectivamente). Essas maiores perdas podem estar relacionadas com o acréscimo de ácido acético nessas silagens, pois segundo McDonald; Henderson; Heron (1991), as perdas de matéria seca para produção de ácido acético são de 24%.

Com relação às variáveis mensuradas durante o período de exposição aeróbia, foi verificada superioridade das silagens do tratamento controle. Essa superioridade possivelmente ocorreu pela tendência de maior concentração de ácido acético nessas silagens. Os resultados da inoculação de silagens de cana-de-açúcar com *L. buchneri* têm sido variáveis. Vários estudos foram conduzidos e observaram respostas positivas, como melhoria na estabilidade aeróbia e redução na contagem de leveduras nas silagens de cana-de-açúcar inoculadas com *L. buchneri* (SIQUEIRA et al., 2007; PEDROSO et al., 2008; MENDES et al., 2008; MAEDA et al., 2011) enquanto outros estudos não detectaram diferenças (FREITAS et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2010). Segundo Schmidt (2008), a variabilidade no padrão de resposta à aplicação deste inoculante parece ser superior à de outros aditivos, possivelmente porque muitos fatores podem afetar o desenvolvimento dos microrganismos, como população epifítica, temperatura da silagem, ambiente, composição de carboidratos, entre outros.

4.4.3 Silagem de capim elefante cv. Napier

No momento da abertura dos silos experimentais, foram detectadas diferenças ($P < 0,05$) nos teores de MS e PB (Tabela 35). As silagens do tratamento LB+LP apresentaram maiores teores de matéria seca, e menores concentrações de PB. As concentrações de proteínas decresceram 19,9% nas silagens do tratamento controle e 22,7% no tratamento LB+LP. Uma possível explicação seria a expectativa de crescimento de clostrídeos proteolíticos, *Clostridium sporogenes* e *Clostridium bifermentans*, os quais fermentam principalmente aminoácidos. (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Com a fermentação por clostrídeos podemos observar perdas de até 51,1% de MS e até 20,9% de energia.

O crescimento de clostrídeos é estimulado pela alta temperatura de estocagem ($>30^{\circ}\text{C}$), baixo teor de matéria seca ($<30\%$), baixo teor de carboidratos solúveis e alta capacidade de tamponamento. Quando o pH baixo não é atingido ($>4,6$), a atividade dos clostrídeos será encorajada (PITT et al., 1990). Essas foram as características das silagens de capim elefante cv. Napier no presente estudo, que no momento da ensilagem, apresentou teores de matéria seca de 19,35%. Após a abertura dos silos foi possível verificar que os valores de pH não decresceram a níveis considerados ideais, permanecendo maiores que 5,3. Esses valores de pH estão acima dos trabalhos encontrados na literatura, onde o pH variou de 3,56 até

5,01 (RODRIGUES et al., 2001, 2003; PATRIZI et al., 2004; PEREIRA et al., 2007; FERREIRA et al., 2011). Andrade; Melotti, (2004) ensilaram capim elefante cv, Napier com 15,30% de matéria seca e também observaram altos valores de pH, de 5,36 nas silagens do tratamento controle.

Outra variável que corrobora com a fermentação clostridica é a produção de ácido butírico. Foram observadas concentrações de 2,50% MS no tratamento controle e 2,80% MS no tratamento LB+LP. Não foram analisadas as concentrações de aminas biogênicas nas silagens, mas no momento da abertura dos silos foi detectado odor extremamente fétido. Odor esse, característico de silagens degradadas por ação de clostrídeos. Segundo McDonald; Henderson; Heron (1991), silagens de capim bem preservadas apresentam teores abaixo de 0,1%, o que é comumente encontrado em silagens de capins aditivadas ou não (RODRIGUES et al., 2003; ANDRADE; MELOTTI, 2004; FERREIRA et al., 2011).

Durante o período de exposição aeróbia ficou evidente a baixa qualidade nutritiva dessas silagens. Com baixas concentrações de ácido láctico, principal substrato para o crescimento das leveduras, as silagens praticamente não apresentaram aquecimento. As altas concentrações de ácido acético também podem ter inibido o crescimento de leveduras.

4.5 Conclusões

A inoculação com *Lactobacillus buchneri* exclusivamente ou em combinação com *Lactobacillus plantarum* em dose de 10^5 ufc/g de forragem fresca não foi efetivo em melhorar o padrão de fermentação e estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar, milho ou capim elefante cv. Napier.

A composição química original dessas fontes de forragens explica, ao menos parcialmente, os parâmetros avaliados nas silagens.

Referências

ALLI, I.; FAIRBAIRN, R.; BAKER, B.E. The effects of ammonia on the fermentation of chopped sugarcane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 9, p. 291-299, 1983.

ANDRADE, S. J. T.; MELOTTI, L. Efeito de alguns tratamentos sobre a qualidade da silagem de capim-elefante cultivar Napier (*Pennisetum purpureum*, Schum). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo. v. 41, p. 409-415, 2004.

ANDRADE, J.B.; JÚNIOR, E.F.; POSSENTI, R.A.; LEINZ, F.F.; BIANCHINI, D.; RODRIGUES, C.F.C. Valor nutritivo de silagem de cana-de-açúcar, cortada aos 7 meses de idade, tratada com uréia e adicionada de rolão de milho. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38. Piracicaba, 2001.

Anais..Piracicaba: SBZ, 2001. CD-ROM.

ARRIOLA, K.G.; KIM, S.C.; ADESOGAN, A.T. Effect of applying inoculants with heterolactic or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation and quality of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 1511-1516, 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117 p.

ÁVILA, C.L.S.; PINTO, J.C.; OLIVEIRA, D.P.; SCHWAN, R.F. Aerobic stability of sugar cane silages with a novel strain of *Lactobacillus* sp. isolated from sugar cane. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 249-255, 2012.

ÁVILA, C.L.S.; PINTO, J.C.; SUGAWARA, M.S.; SILVA, M.S.; SCHWAN, R.F. Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 255-261, 2008.

ÁVILA, C.L.S.; PINTO, J.C.; FIGUEIREDO, H.C.P.; SCHWAN, R.F. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 6, p. 384-394. 2009.

BERZAGHI, P.; COZZI, G.; ANDRIGHETTO, I. The use of near infrared analysis for *in situ* studies. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.80, n.12, p.3263-3270, 1997.

BEUCHAT, L. R.; COPELAND, F.; CURIALE, M.S.; DANISAVICH, T.; GANGAR, V.; KING, B.W.; LAWLIS, T.L.; LIKIN, R.O.; OKWUSOA, J.; SMITH, C.F.; TOWNSEND, D.E. Comparison of the simplate total plate count method with petrifilm, redigel, and conventional pour-plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 1, p.14-18, 1998.

CARVALHO, B. F.; ÁVILA C. L. S.; PINTO, J. C.; PEREIRA, M. N.; SCHWAN, R. F., 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, doi: 10.1111/j.1365-2494.2012.00863. 2012.

COZZOLINO, D.; ACOSTA, Y.; GARCIA, J. Application of near infrared reflectancy spectroscopy (NIRS) to forage evaluation in Uruguay. In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 19., 2001. São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 370.

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

DRIEHUIS F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VAN WIKSELAAR, P.G. *Lactobacillus buchneri* improves aerobic stability of laboratory and farm scale whole crop maize silage but does not affect feed intake and milk production of dairy cows. In: Pauly T., Lingvall P., Burstedt E., Knutsson K.G., Lindgren S., Murphy M. and Wiktorsson H. (eds) **Proceedings of the 12th International Silage Conference**, Uppsala p. 264–265. ,1999.

FERREIRA, D.J.; ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M.; LANA, R.P.; SILVA, W.L.; SOUZA, A.L.; PEREIRA, O.G. Perfil fermentativo e valor nutritivo de silagem de capim-elefante inoculada com *Streptococcus bovis*. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 232, p. 1223-1228, 2011.

FILYA, I. Aerobic stability of sorghum and maize silages treated with homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria Proc. Turkey-Israeli **Workshop on Silage and Agricultural By-Products for High Lactating Cows**, Bet Dagan, 2001, p. 24–26.

FREITAS, A.W.P.F.; PEREIRA, J.C.; ROCHA, F.C.; COSTA M. G.; LEONEL F. P.; RIBEIRO, M. D.. Avaliação da qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar com aditivos microbianos e enriquecida com resíduos da colheita da soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 38-47, 2006.

FILYA, I.; KARABULUT, A.; SUCU, E., The effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of maize silage in warm climate Proc. **XIII International Silage Conference**, Auchincruive, Ayr, Scotland, pp. 192–193, 2002.

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

HU, W.; SCHMIDT, R.J.; McDONELL, E.E.; KLINGERMAN, C.M.; KUNG JR., L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, p. 3907-3914, 2009.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, R.A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia** Viçosa, v. 36, p. 101-119, 2007.

KNIGHT, M.; NEWMAN, M.; BENZINGER, K.; NEUFANG, J.; AGIN, J.; MCALLISTER,; RAMOS, M. Comparison of the petrifilm dry rehydratable film and conventional culture methods for enumeration of yeasts and molds in foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 80, n. 4, p. 806-823, 1997.

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

KUNG Jr., L.; STANLEY, R.W. Effect of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved as silage. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 54, p. 689-696, 1982.

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

MAEDA, E.M.; ZEOULA, L.M.; JOBIM, C.C.; BERTAGLIA, F.; JONKER, R.C.; GERON, L.J.V.; HENRIQUE, D.S. Chemical composition, fermentation, *in vitro* digestibility and *in situ* degradability of sugar cane silages with *Lactobacillus*, urea and agricultural byproduct. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 12, p. 2866-2877, 2011.

McDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. **The biochemistry of silage**. Manchester: John Wiley, 1991. p. 81-151.

MENDES, C.Q.; SUSIN, I.; NUSSIO, L.G.; PIRES, A.V.; RODRIGUES, G.H.; URANO, F.S. Efeito do *Lactobacillus buchneri* na fermentação, estabilidade aeróbia e no valor nutritivo de silagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 12, p. 2191-2198, 2008.

MUCK, R.E. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v.47, n.4, p.1011-1016, 2004.

NISHINO, N.; WADA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H. Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 87, p. 2563–2570, 2004.

NUSSIO, L.G. Silage production from tropical forages. In: PARK, R.S.; STRONGE, M.D. (Ed.). **Silage production and utilization**. Belfast: Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2005. p. 97-108.

O'KIELY, P.O.; CLANCY, M.; DOYLE, E.M. Aerobic stability of grass silage mixed with a range of concentrate feedstuffs at feed-out. In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 19., 2001. São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 794-795.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 31-94.

PATRIZI W.L.; MADRUGA JÚNIOR, C.R.F.; MINETTO T.P.; NOGUEIRA E.; MORAIS, M.G. Efeito de aditivos biológicos comerciais na silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.56, n.3, p.392-397, 2004.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F.; LOURES, D.R.S; IGARASI, M.S.; COELHO, R.M; PACKER I.H.; HORI, J; GOMES, L.H. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 5, p. 427-432, 2005.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; LOURES, D.R.S.; PAZIANI S. F.; RIBEIRO J. L.; MARI L. J.; ZOPOLLATTO M.; SCHMIDT P.; MATTOS W. R. S; HORII J., Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical and bacterial additives. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.65, p.567-691, 2008.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F; LOURES, D.R.S.; IGARASI, M.S.; MARI, L.J; COELHO, R.M; RIBEIRO, J.L.; ZOPOLLATTO, M.; HORII, J. Bacterial inoculants and chemical additives to improve fermentation in sugar cane (*Saccharum officinarum*) silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive: SAC, 2002. p. 66.

PEDROSO, A. F.; RODRIGUES, A. A.; BARIONI JUNIOR, W.; SOUZA, G. B., Fermentation parameters, quality and losses in sugarcane silages treated with chemical additives and a bacterial inoculant. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 11, Nov. 2011.

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

PRYCE, J.D. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, Cambridge, v. 94, p. 1151-1152, 1969.

QUEIROZ, O.C.M.; ADESOGAN, A.T.; ARRIOLA, K.G.; QUEIROZ, M.F.S. 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, p. 3354–3362, 2012.

RANJIT, N.K.; TAYLOR, C.C.; KUNG Jr., L. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 57, p. 73-81, 2002.

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

RODRIGUES, P.H.M.; LOPES, T.F.T.; ANDRADE, S.J.T.; MELOTTI, L.; LUCCI, C.S.; LIMA, F.R.; MEYER, P.M. Adição de inoculantes microbianos sobre a composição química e perfil fermentativo da silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 397-402, 2003.

RODRIGUES, P.H.M.; ANDRADE, S.J.T.; FERNANDES, T.; LIMA, F.R.; MELOTTI, L.; LUCCI, C.S.; Valor nutritivo da silagem de capim-elefante cultivar Napier (*Pennisetum purpureum*, Schum) inoculada com bactérias ácido-láticas **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 809-813, 2001.

SANT'ANA, A.D.S.; AZEREDO, D.R.P. Comparação entre o sistema Petrifilm RSA® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 531-535, 2005.

SCHMIDT, P.; MARI L. J.; NUSSIO L. G.; PEDROSO, A. F.; PAZIANI, S. F.; WECHSLER F. S. Aditivos químicos e biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar. 1. Composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.5, p.1666-1675, (supl.) 2007.

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKENITURRINO, R.P.; PIRES, A.J.V.; BERNARDES, T.F.; ROTH, M.T.P. Queima e aditivos químicos e bacterianos na ensilagem da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n.1, p.103-112, 2010.

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; PIRES, A.J.V.; BERNARDES, T.F.; AMARAL, R.C. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 6, p. 2000-2009, 2007.

SOUSA, G.B.; TAMAGNINI, L.M.; GONZALEZ, R.D.; BUDDE, C.E. Evaluation of Petrifilm method for enumerating aerobic bacteria in Crottin goat cheese. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 37, n. 4, p. 214-216, 2005.

SOUSA, D. P.; MATTOS, W. R. S.; NUSSIO L. G.; MARI L. J.; RIBEIRO J. L.; SANTOS M. C.; Efeito de aditivo químico e inoculantes microbianos na fermentação e no controle da produção de álcool em silagens de cana-de-açúcar **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n.9, p.1564-1572, 2008.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS User's guide**: statistics. version 9.1.3. Cary, 2003. 965 p.

TABACCO, E.; PIANO, S.; REVELLO-CHION, A.; BORREANI, G. 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, p. 5589-5598, 2011.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WEINBERG, Z.G.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; AZRIELI, A.; SZAKACS, G.; FILYA, I. Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 28, p. 7–11, 2002.

ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M.; FERREIRA, D.J.; PEREIRA, O.G.; PINTO, L.F.B. Características fermentativas e composição químico-bromatológica de silagens de capim-elefante com ou sem *Lactobacillus plantarum* e farelo de trigo isoladamente ou em combinação. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, n. 4, p. 621-628, 2007.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A inoculação de forragens tropicais com *Lactobacillus buchneri* em doses superiores a 5×10^5 ufc/g de forragem, bem como o armazenamento por períodos superiores à 60 dias melhoram as características fermentativas e estabilidade aeróbia dessas silagens. Doses superiores pode compensar, parcialmente, a redução no período de fermentação.

O corte da forragem com teor de matéria seca inadequado para ensilagem, acima de 35% para silagens de milho e abaixo de 25% para silagens de capim elefante, pode afetar negativamente a eficácia dos aditivos microbianos.