



MARCUS VINICIUS SANTA BRÍGIDA CARDOSO

**ALIMENTOS CONSERVADOS EM FAZENDAS LEITEIRAS:
UTILIZAÇÃO EM PROGRAMAS NUTRICIONAIS E
CONTROLE DA DETERIORAÇÃO AERÓBIA POR MEIO DE
INOCULANTES**

**LAVRAS - MG
2019**

MARCUS VINICIUS SANTA BRÍGIDA CARDOSO

**ALIMENTOS CONSERVADOS EM FAZENDAS LEITEIRAS: UTILIZAÇÃO EM
PROGRAMAS NUTRICIONAIS E CONTROLE DA DETERIORAÇÃO AERÓBIA
POR MEIO DE INOCULANTES**

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

Prof Dr. Thiago Fernandes Bernardes

Orientador

LAVRAS – MG

2019

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

Cardoso, Marcus Vinicius Santa Brigida.

Alimentos conservados em fazendas leiteiras: utilização em programas nutricionais e controle da deterioração aeróbia por meio de inoculantes / Marcus Vinicius Santa Brigida Cardoso. - 2019.
68 p.

Orientador(a): Thiago Fernandes Bernardes.

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

Bibliografia.

1. Conservação de alimentos. 2. Estabilidade aeróbia. 3. Inoculantes. I. Bernardes, Thiago Fernandes. II. Título.

MARCUS VINICIUS SANTA BRÍGIDA CARDOSO

**ALIMENTOS CONSERVADOS EM FAZENDAS LEITEIRAS: UTILIZAÇÃO EM
PROGRAMAS NUTRICIONAIS E CONTROLE DA DETERIORAÇÃO AERÓBIA
POR MEIO DE INOCULANTES**

**FEED CONSERVATION ON DAIRY FARMS: UTILIZATION IN FEEDING
PROGRAMS AND CONTROL OF AEROBIC DETERIORATION BY INOCULANTS**

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

APROVADA em 22 de Março de 2019.

Dr. Aníbal Coutinho do Rêgo – UFRA

Dr. Daniel Rume Casagrande – UFLA

Prof Dr. Thiago Fernandes Bernardes
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por todas as portas que me foram abertas até hoje para que eu consiga alcançar meus objetivos.

Aos meus pais Elias Navarro e Sandra Catarina por todos os ensinamentos, toda a educação, carinho, amor, e apoio prestado durante esses anos. Vocês são meus principais pilares durante toda essa caminhada. Obrigado por tudo. Amo vocês.

Ao meu irmão Victor Cardoso, minhas tias, meus tios e todos os meus familiares que, mesmo longe, estão sempre me apoiando.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade de permitir que eu aprimore meus conhecimentos.

Ao meu ilustre e honrado orientador Prof. Thiago Fernandes Bernardes por todo o conhecimento, paciência, orientação, conselhos, “puxões de orelha”, apoio, amizade, mas principalmente por ter acreditado em mim e ter me concedido a oportunidade de ser seu aluno. Serei eternamente grato.

Aos meus parceiros (as) da pós-graduação, em especial Luciana Lima (Lu), Jéssica Gusmão (Jhuli), Isabella Lasmar (Colega), Elizanne Lima (Blogueirinha) e Márcio Bastos (Marcim) pelo todo o apoio, força e principalmente a amizade. Sempre me lembrarei de vocês. Vocês são ótimos.

Aos meus amigos do grupo da conservação e ao grupo NEFOR que sempre estiveram dispostos a me ajudar com os experimentos e pelo companheirismo durante esses anos.

Aos demais professores da forragem Prof Carla Ávila, Prof Daniel Casagrande e Prof Márcio Lara pelos conhecimentos repassados dentro e fora das salas de aula.

À Provita Supplements e ao técnico Rafael Andrade pelo apoio e fornecimento dos materiais necessários para realização da pesquisa.

A todos os nutricionistas que dedicaram um tempo da sua rotina para responder os formulários.

Às técnicas do Laboratório de Química, Lidiany Lima e Franciane Campos por toda a paciência e principalmente apoio prestado durante a realização das minhas “2.000” amostras. Na próxima serão “4.000”.

Aos demais amigos que ganhei durante esses anos, em especial Bianca, Paola, Jéssica, Fernanda, Leonardo, Sérgio, entre outros, pela amizade e momentos de descontração dentro e fora da universidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos aqueles que de direta ou indiretamente contribuíram para a realização e finalização deste trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos...

Muito obrigado!!!

RESUMO GERAL

Com o objetivo de conhecer os programas de alimentação de vacas em rebanhos leiteiros de alta produção e melhorar a estabilidade aeróbia de silagens de planta inteira de milho, foram realizados dois estudos. No primeiro estudo foi realizado um levantamento com 145 fazendas nos 6 maiores estados produtores de leite do Brasil. O objetivo foi conhecer a utilização de forragens nos programas nutricionais adotados pelos produtores em sistemas intensivos de produção leiteira. Um formulário contendo 16 perguntas, incluindo informações das características do rebanho (n=5) e da dieta (n=11) foi utilizado. A silagem de planta inteira de milho esteve em 100% das dietas. Silagem de grão úmido, reconstituído e espigas eram usados por 24,8, 16,6 e 3,4% das propriedades, respectivamente. Sessenta e nove por cento das propriedades utilizavam uma ou mais segundas fontes de forragem na dieta. Feno, forragem fresca e pré-secado eram utilizadas por 45,5, 28,3 e 31,0% das propriedades, respectivamente. No segundo estudo, o objetivo foi determinar o efeito da inoculação e do tempo de estocagem no perfil fermentativo, contagem de microrganismos, deterioração aeróbia e estabilidade aeróbia de silagens de planta inteira de milho. Os tratamentos foram silagem de milho sem inoculante (CONTROL), silagem de milho inoculada com associação entre *L. plantarum* DSM 12837, *L. rhamnosus* NCIMB 30121 e *L. buchneri* DSM 12856 (C1), e silagem de milho inoculada com associação entre *L. rhamnosus* NCIMB 30121, *L. buchneri* DSM 12856 e *L. diolivorans* DSM 32074 (C2), estocadas durante 15, 30, 45 e 90 dias. Matéria seca, pH, produtos finais da fermentação e contagem de microrganismos das silagens foram avaliadas. As silagens foram submetidas a um teste de estabilidade e deterioração aeróbia, por 10 dias. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com um arranjo fatorial 3x4, com quatro repetições. O tempo de estocagem reduziu o teor de MS ($P < 0,0001$) em 3,8% entre as silagens estocadas por 30 e 90 dias de ensilagem. A inoculação ($P = 0,010$) e o tempo de estocagem ($P = 0,010$) reduziu a contagem de leveduras. A contagem de fungos filamentosos foi afetada pela inoculação ($P = 0,0014$). A contagem de BAL foi afetada pela interação inoculação x tempo de estocagem ($P < 0,0001$), com maior contagem nas silagens C1 e C2. O tempo de estocagem elevou a concentração de ácido láctico ($P < 0,0001$) de 5,66 para 6,36% na MS, de 30 para 45 dias de estocagem. A concentração de ácido acético e as perdas na deterioração aeróbia foram afetadas pela inoculação ($P < 0,05$) e pelo tempo de estocagem ($P < 0,05$). As demais variáveis foram afetadas pela interação inoculação x tempo de estocagem ($P < 0,05$). As concentrações de ácido propiônico e 1,2-propanodiol foram maiores e menores com 45 e 90 dias de ensilagem, respectivamente, na silagem C2. As silagens inoculadas obtiveram um aumento na estabilidade aeróbia de, aproximadamente, 23, 31 e 115 horas quando estocadas por 30, 45 e 90 dias, respectivamente. Silagens inoculadas e estocadas por 45 dias obtiveram estabilidade aeróbia superior às silagens CONTROL armazenadas por 90 dias.

Palavras-chave: Conservação de forragem. Estabilidade aeróbia. Inoculante bacteriano. Programa de alimentação de vacas. Silagem de milho

GENERAL ABSTRACT

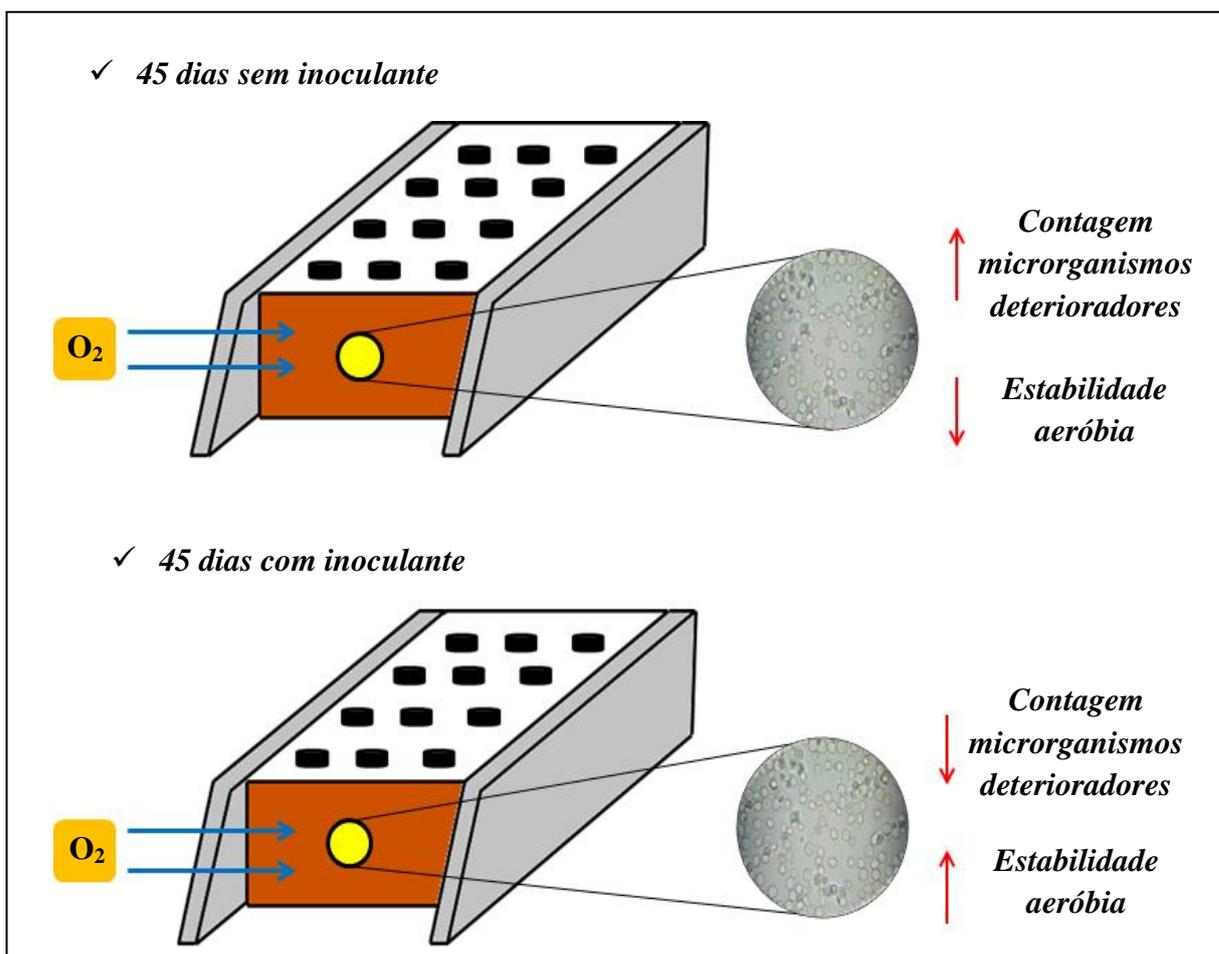
In order to survey the cow feeding programs in high-producing dairy herds and to improve aerobic stability of whole-plant corn silage, two studies were carried out. In the first study, a survey was carried out with 145 farms across the top 6 milk producing Brazilian states. The aim was to survey the use of forage in the feeding programs adopted by farms on intensive dairy production systems. A form consisted of 16 questions, including information on the characteristics of the herd (n=5) and diet (n=11) was used. The whole-plant corn silage was in 100% of the diets. High-moisture corn silage, reconstituted grain corn, and snaplage were used by 24.8, 16.6, and 3.4% of the farms, respectively. Sixty-nine percent of the farms had one or more second forage source in the diets. Hay, fresh forage and haylage were used by 45.5, 31.0 and 28.3% of the farms, respectively. In the second study, the aim was to determine the effect of inoculation and storage time on fermentation profile, microbial counts, aerobic deterioration and aerobic stability of whole-plant corn silage. The treatments were corn silage without inoculant (CONTROL), inoculated corn silage with association of *L. plantarum* DSM 12837, *L. rhamnosus* NCIMB 30121 and *L. buchneri* DSM 12856 (C1), and inoculated corn silage with association of *L. rhamnosus* NICMB 30121, *L. buchneri* DSM 12856 and *L. diolivorans* DSM 32074 (C2), stored for 15, 30, 45 and 90 days. Dry matter, pH, fermentation end-products and microorganisms counts of silages were evaluated. The silages were subjected to an aerobic stability and deterioration assay for 10 days. A completely randomized design was used, with a 3x4 factorial arrangement, with four replications. The storage time reduced DM content ($P < 0.0001$) in 3.8% among silages with 30 and 90 days of ensiling. The inoculation ($P = 0.010$) and storage time ($P = 0.010$) reduced yeast counts. The mold counts was affected by inoculation ($P = 0.0014$). The LAB counts was affected by interaction inoculation x storage time ($P < 0.0001$), with higher counts in C1 and C2 silages. The storage time increased lactic acid concentration ($P < 0.0001$) from 5.66 to 6.36% DM, from 30 to 45 days of ensiling. Acetic acid concentration and aerobic losses were affected by inoculation ($P < 0.05$) and storage time ($P < 0.05$). The others variables were affected by interaction inoculation x storage time ($P < 0.05$). Propionic acid and 1,2-propanediol concentrations were higher and lower with 45 and 90 days of ensiling, respectively, in C2 silage. Inoculated silages had an increase on aerobic stability about 23, 31 and 115 hours when stored for 30, 45 and 90 days, respectively. Inoculated silages and stored for 45 days obtained higher aerobic stability in compare to CONTROL silages stored for 90 days.

Keywords: Forage conservation. Aerobic stability. Bacterial inoculant. Cow feeding program. Corn silage.

RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

Na etapa inicial deste estudo, o propósito foi de conhecer como está o uso de alimentos conservados na dieta de vacas leiteiras em sistemas intensivos de produção. Esta etapa foi realizada com a aplicação de formulários eletrônicos em propriedades brasileiras, com questões que abordavam as características da fazenda e sobre o programa nutricional adotado para alimentação dos animais. Identificou-se que a silagem de planta inteira de milho está presente em todos os programas nutricionais adotados, enquanto que silagens de grãos participam em mais da metade das propriedades. Contudo, são alimentos altamente instáveis quando expostos ao oxigênio, o que favorece o processo de deterioração por leveduras e fungos filamentosos.

A segunda etapa do estudo foi determinar uma forma de controlar a deterioração aeróbia em silagens com períodos de estocagem mais curtos (45 dias) que, geralmente, apresentam baixa estabilidade. Para isso, foi proposto o uso de inoculantes combos (duas ou mais bactérias) com cepas capazes de controlar a atividade microbiana e de aumentar a concentração de ácidos fracos dessas silagens com menor tempo de estocagem. De fato, com a inoculação, foi possível obter uma silagem mais “nova” com boa estabilidade aeróbia equivalente a uma silagem estocada por mais tempo (90 dias), o que não é possível em silagens sem a presença do inoculante.



SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Silagem de milho na alimentação animal	13
2.2 Processo de deterioração aeróbia	14
2.3 Inoculantes bacterianos e estabilidade aeróbia de silagens	17
2.4 Bactérias ácido lácticas (BAL)	18
REFERÊNCIAS	23
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	27
ARTIGO 1 – USO DE ALIMENTOS CONSERVADOS EM DIETA DE VACAS EM LACTAÇÃO EM SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUÇÃO	27
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
3 RESULTADOS	31
4 DISCUSSÃO	37
5 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ARTIGO 2 – EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE <i>Lactobacillus buchneri</i> e <i>Lactobacillus diolivorans</i> SOBRE A ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE MILHO	46
1 INTRODUÇÃO	48
2 MATERIAL E MÉTODOS	49
3 RESULTADOS	52
4 DISCUSSÃO	60
5 CONCLUSÃO	65
6 IMPLICAÇÕES	66
REFERÊNCIAS	67

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A conservação de alimentos (e.g. silagem) é uma atividade conhecida no Brasil, que até o início do século passado era adotada por poucos produtores em função dos custos envolvidos com o uso de máquinas e equipamentos. Atualmente, a introdução destes implementos nas etapas de produção de alimentos conservados é realidade em grande parte das propriedades no Brasil. A terceirização de serviços nas etapas de colheita e ensilagem dos alimentos conservados foi um dos grandes responsáveis pela crescente adoção dessa tecnologia nas fazendas leiteiras (BERNARDES et al., 2013).

O surgimento de novas colhedoras no mercado (e.g. autopropelidas) acopladas a processadores de grãos tem melhorado a eficiência da colheita e as características dos alimentos conservados (DANIEL et al., 2014). Além disso, a busca pela produção do próprio alimento concentrado dentro da propriedade tem impulsionado o uso de tecnologias como silagens de grãos úmidos ou reidratados. Atrelado a isso, o desenvolvimento de novos equipamentos de colheita tem permitido a introdução de capins tropicais como forragem conservada (silagem, feno ou pré-secado), dando aos produtores uma nova alternativa de suplementação forrageira nos programas nutricionais da fazenda.

Em contra partida, alimentos conservados de melhor valor nutricional podem ser acometidos por processos bioquímicos durante e após a sua produção, como é o caso da silagem de milho, apresentando baixa estabilidade aeróbia (WEINBERG; MUCK, 1996). A atividade microbiana durante a exposição desse e outros alimentos conservados ao oxigênio caracteriza o processo de deterioração, com consequentes perdas nutricionais (McDONALD et al., 1991). Uma das alternativas em controlar a ação dos microrganismos deterioradores consiste no uso de inoculantes bacterianos, em especial as BAL, durante o processo de ensilagem.

Durante a década de 90, inoculantes baseados em cepas de BAL que apresentam a via heterofermentativa, como a *Lactobacillus buchneri*, foram propostos (MUCK, 1996). Desde então, diversos estudos já revelaram a eficácia desta bactéria em controlar o processo de deterioração aeróbia desses alimentos (PAHLOW et al., 2003; MUCK et al., 2018). Entretanto, ainda é recorrente o lançamento de novos inoculantes com a associação entre BAL homofermentativas e heterofermentativas, denominados combo (KLEINSCHMIT; KUNG, 2006). Isto, então, nos remete à necessidade de se obter mais conhecimento sobre a real

efetividade destes tipos de inoculantes e da eficiência de novas cepas de BAL sobre as características dos alimentos conservados durante o processo de ensilagem.

Desse modo, objetivou-se com os presentes trabalhos: i.) conhecer a real utilização do uso de alimentos conservados que compõem a dieta de vacas em lactação em sistemas intensivos de produção; ii.) avaliar o perfil fermentativo, contagem de microrganismos, deterioração e estabilidade aeróbia de silagens de planta inteira de milho, com ou sem inoculante bacteriano, em diferentes tempos de estocagem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Silagem de milho na alimentação animal

A utilização de práticas consideradas técnicas no campo, de modo geral, tem como principal objetivo não apenas maximizar o sistema de produção ou o potencial produtivo de um animal, mas sim de proporcionar uma melhor relação entre os objetivos que circundam o sistema de produção, mantendo a sustentabilidade do mesmo. É neste cenário que ocorre a busca, por exemplo, de técnicas de conservação de alimentos com o objetivo de garantir a alimentação e a oferta de forragem de melhor valor nutricional para os animais, principalmente para aqueles de maior demanda (FAVERDIN et al., 2011).

A silagem é um produto originado pelo processo de conservação de forragem, através da fermentação de açúcares em ácidos orgânicos por bactérias ácido lácticas, em ambiente anaeróbio, os quais possuem a função de preservar a massa ensilada conservando o valor nutricional da forragem *in natura*, com o mínimo de perdas. A cultura do milho na forma de silagem na alimentação animal é de grande importância, sendo a cultura mais utilizada pelos produtores para a confecção de silagem, em fazendas de gado leiteiro (BERNARDES et al., 2013).

A busca por forragens conservadas também se dá devido uma melhor relação custo/benefício, pois a sua utilização nos sistemas de produção como alternativa de suplementação, seja como feno ou silagem, são menos onerosos quando comparados ao uso de concentrados na dieta de ruminantes. De fato, a participação deste volumoso na dieta de vacas leiteiras pode variar de 35 a 80%, dependendo do nível de exigência nutricional e da produtividade desses animais (BERNARDES; CARDOSO; LIMA, 2018).

Comparado com outras fontes de forragem, a silagem de milho é aquela que apresenta um valor nutricional superior, em função do amido da planta e também da fibra, obtendo maiores produtividades pelos animais (GOMES et al., 2002). A presença da fibra estimula a salivação dos animais, bem como a mastigação e a ruminação, evitando possíveis distúrbios metabólicos nos animais (WEISS, 1999). O milho como fonte de amido, por sua vez, pode melhorar as características de fermentação ruminal se utilizado corretamente, melhorando o uso de carboidratos estruturais e aumentando o fluxo de proteína microbiana para o intestino, em virtude da maior eficiência da utilização de fontes de nitrogênio não proteico (GONÇALVES; BORGES, FERREIRA, 2009).

A produção de silagem consiste num processo de várias etapas que vai desde o plantio da cultura até a vedação do silo. Em se tratando de silagens, em especial aquelas altamente instáveis em virtude seu maior valor nutricional, como é o caso do milho, a preocupação com a qualidade do alimento produzido deve ser fundamental mesmo após a abertura do silo.

Silagens de milho são fortemente afetadas pelo processo de deterioração aeróbia, consequência das altas concentrações de ácido lático na massa ensilada (WEINBERG; MUCK, 1996). Animais de alta produção, em especial vacas leiteiras, podem sofrer forte influência de diversos fatores interligados ao sistema, principalmente àqueles relacionados à alimentação, refletindo na sua produtividade.

A alimentação é um dos fatores mais importantes a serem considerados dentro do sistema de produção, visto que o desempenho animal está diretamente relacionado com o consumo da dieta (AGUIAR et al., 2013). Com isso, é de extrema importância que a qualidade deste componente da dieta seja avaliada de forma constante durante todo o manejo alimentar da propriedade e técnicas que visem garantir um alimento de qualidade sejam adotadas nas propriedades.

2.2 Processo de deterioração aeróbia

A deterioração aeróbia é tida como um processo decorrente da ação de diversos microrganismos aeróbios que irão atuar durante a fase de desabastecimento. Esse processo ocorre devido o uso dos produtos finais da fermentação da silagem, como o ácido lático, e carboidratos solúveis como substratos para o crescimento de microrganismos na presença do oxigênio quando o silo é aberto (PAHLOW et al., 2003).

Em silagens, esse processo necessita de uma considerável atenção, principalmente para silagens de culturas produtoras de grãos por serem mais propensas à deterioração em comparação, por exemplo, às silagens de capim (WOOLFORD; BOLSEN; PEART, 1982; WILKINSON; DAVIES, 2012). A minimização dos efeitos deletérios desse processo através do controle de microrganismos deterioradores, com o consequente aumento do pH e temperatura e perdas de MS da silagem, é uma forma de garantir a segurança e o valor nutricional da silagem durante e após todas as etapas do processo de ensilagem (DRIEHUIS, 2013).

O abastecimento dos silos acarreta em grandes modificações no perfil da planta durante a estocagem desse material como, por exemplo, a contagem de microrganismos. Em função das condições de anaerobiose, a carga microbiana pode ocasionar alterações nos

valores de pH (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2005), bem como no teor de nutrientes da silagem. Entende-se por anaerobiose como um ambiente livre da presença do gás oxigênio (O_2), sendo este uma das condições mais importantes no que diz respeito ao processo fermentativo.

A presença do oxigênio no interior do silo após a sua vedação pode afetar a eficiência do processo fermentativo, bem como aumentar os riscos com deterioração da massa. A retirada do oxigênio que ocorre durante a etapa de compactação permite um maior controle da respiração celular da planta ensilada, além de inibir o crescimento e a atividade de microrganismos aeróbios capazes de deteriorar a forragem (WOOLFORD, 1990). Vale ressaltar que a etapa de desabastecimento do silo provoca alterações muito similares, porém de forma mais intensa quando comparadas àquelas que ocorrem durante a fase aeróbia do processo fermentativo, onde a principal diferença entre elas está na quantidade de oxigênio disponível em cada etapa.

Na fase aeróbia, o oxigênio residual se limita àquela quantidade que não foi expulsa do interior do silo durante o processo de compactação da forragem. Na etapa de desabastecimento, por sua vez, o oxigênio se encontra em quantidades ilimitadas na superfície do silo, favorecendo o crescimento e a atividade dos microrganismos deterioradores aeróbios ou anaeróbios facultativos (BOLSEN; ASHBELL; WEINBERG, 1996).

Os microrganismos aeróbios são assim classificados devido à necessidade da presença do oxigênio no ambiente para o correto funcionamento do seu metabolismo. No processo de respiração celular aeróbia, o oxigênio é o receptor final do hidrogênio oriundo da oxidação das moléculas de NADH e FADH na fosforilação oxidativa, formando água e produzindo ATP (MOREIRA, 2013).

Em se tratando dos microrganismos anaeróbios ou anaeróbios facultativos, o oxigênio não é utilizado para a produção de energia, podendo até mesmo acarretar em quadros de toxicidade dependendo do nível de tolerância desses microrganismos ao oxigênio. Essa toxicidade do oxigênio ocorre pela produção de moléculas nas reações que envolvem o oxigênio como, por exemplo, os radicais superóxido que causam danos celulares e originam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxila (OH), podendo destruir o DNA das células (MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2000).

A ausência da enzima superóxido dismutase pelos microrganismos anaeróbios não permite a eliminação desses radicais através da sua conversão em peróxidos, como ocorre nos microrganismos aeróbios. Esses peróxidos são então metabolizados por outras duas enzimas:

a catalase que irá formar oxigênio molecular e água pela conversão do H_2O_2 e a peroxidase, formando água (MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2000).

Desse modo, torna-se desejável que a quantidade de oxigênio remanescente no interior do silo após a sua completa vedação seja em quantidades mínimas possíveis visto que, aliada às condições de manejo, as perdas de MS em função da atividade microbiana podem chegar a mais de 30% durante a etapa de desabastecimento, em conjunto com a deterioração nas regiões mais superficiais do silo (BORREANI et al., 2018).

Não obstante a isso, altas quantidades desse gás podem interferir no processo fermentativo devido à sua influência no metabolismo das bactérias ácido lácticas, além de favorecer a atividade metabólica dos microrganismos deterioradores aeróbios ou anaeróbios facultativos (WOOLFORD, 1990). Dentre eles, as leveduras são aqueles mais relacionados ao processo de deterioração da silagem quando na presença de oxigênio, afetando o seu valor nutritivo e a digestibilidade da forragem (WEINBERG et al., 2011).

As leveduras são consideradas microrganismos eucariontes anaeróbios facultativos e algumas espécies associadas com a produção de silagem são, em geral, ácidos tolerantes, tais como as pertencentes do gênero *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, entre outros (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK, 2011). O início do processo de deterioração pelas leveduras ocorre por estas serem capazes de crescerem em pH de 3,5, valor este muito comum na maioria das silagens (MUCK, 2010). De modo geral, os principais nutrientes utilizados pelos microrganismos para produção de energia são os açúcares simples, como a glicose, sendo que algumas espécies de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, são capazes de degradar carboidratos mais complexos como o amido (PAHLOW et al., 2003; COUTINHO et al., 2013).

Em condições de anaerobiose, as leveduras competem com as bactérias do ácido láctico no início do processo fermentativo pela utilização dos açúcares (e.g. glicose) produzindo etanol e CO_2 , reduzindo não apenas a quantidade dos açúcares disponíveis na massa, mas também aumentando as perdas de matéria seca durante o processo (McDONALD et al., 1991).

Em ambiente aeróbio as leveduras são capazes de utilizar o lactato como substrato, e são os principais microrganismos responsáveis por iniciarem a deterioração aeróbia na maioria das silagens, aumentando o seu pH e a temperatura da silagem (PAHLOW et al., 2003). Com isso, é comum que ocorra a proliferação de outros microrganismos deterioradores durante o desabastecimento do silo, principalmente em virtude da elevação dos valores de pH da silagem (WOOLFORD, 1990).

Os fungos filamentosos são microrganismos que atuam de forma secundária no processo de deterioração (McDONALD et al., 1991). A proliferação de fungos filamentosos na silagem geralmente está relacionada aos estágios mais avançados de deterioração com a formação de bolores na massa, causando redução do valor nutritivo, da palatabilidade do alimento e efeitos negativos na saúde animal e humana com a ingestão de micotoxinas (OLDENBURG, 2000).

Estes microrganismos são estritamente aeróbios e contribuem para o processo de deterioração, mesmo que atuem de forma mais lenta na silagem (MUCK, 2010). Seu crescimento microbiano normalmente é restrito as regiões mais superficiais e periféricas do painel do silo devido uma maior concentração de oxigênio nestas regiões.

Diversas são as espécies que participam do processo de deterioração da silagem, contudo, os fungos filamentosos pertencentes à família das aflatoxinas têm sido a mais estudada dentre estes microrganismos (BERNARDES; O'KIELY, 2013). Os fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados os mais importantes produtores desta micotoxina (OLDENBUR, 1991). Outros gêneros tais como *Monascus*, *Mucor*, *Monilia*, entre outros também podem ser encontrados em silagens que apresentem algum grau de deterioração (BERNARDES; O'KIELY, 2013).

Garantir a qualidade sanitária da silagem produzida dentro da propriedade é de suma importância, uma vez que esta será destinada à alimentação animal. Uma das formas de controlar o processo de deterioração se dá pelo uso de aditivos, seja químico ou bacteriano, para atuar no controle do crescimento de microrganismos deterioradores, garantindo melhorias na estabilidade aeróbia das silagens (TABACCO et al., 2009).

2.3 Inoculantes bacterianos e estabilidade aeróbia de silagens

De modo geral, os inoculantes bacterianos utilizados durante o processo de ensilagem auxiliam na preservação do valor nutritivo da forragem conservada, através da inibição do crescimento de microrganismos deterioradores na massa ensilada, reduzindo as perdas de matéria seca (PAHLOW et al., 2003). Entre as categorias que classificam os aditivos, os inibidores de deterioração aeróbia são aqueles que estão relacionados principalmente com culturas que apresentam uma alta capacidade de deterioração, como a silagem de milho (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

Vale ressaltar que nenhuma bactéria é completamente eficaz contra todos os microrganismos presentes na massa ensilada. Em teoria, a associação de diferentes cepas deve

ser capaz de combinar seus efeitos antimicrobianos a partir do seu produto final formado, compensando essa possível deficiência entre as bactérias no controle dos microrganismos deterioradores.

Um acréscimo na estabilidade aeróbia da silagem de milho pode ser obtido através do uso de inoculantes bacterianos na ensilagem. A composição destes produtos, de modo geral, é formada pela associação de cepas de bactérias do gênero *Lactobacillus*, o qual é comumente utilizado na produção de silagem pelos produtores.

Associado à técnica de inoculação, outra possibilidade de melhorar a estabilidade das silagens está no tempo que a mesma permanece estocada no silo. De fato, quanto maior o tempo de estocagem da planta, maior será a estabilidade da silagem de milho produzida. Em um estudo de meta-análise realizado por Daniel et al. (2014), estes autores concluíram que ocorre um aumento na estabilidade aeróbia das silagens de milho de 0,4 horas por dia em até 110 dias de armazenamento onde, para que a mesma seja maximizada, a silagem deve permanecer estocada por, no mínimo, 90 dias.

Durante esse período, ocorre a metabolização dos carboidratos solúveis em produtos finais da fermentação (e.g. ácido lático e ácido acético) pelas BAL presentes na população epifítica da planta ou quando inoculadas (DER BEDROSIAN; NESTOR; KUNG JR, 2012). Contudo, o processo de deterioração pode se tornar mais intenso em silagens de milho estocadas por longos períodos, devido o maior aporte de substratos e/ou alta concentração de ácidos orgânicos (BERNARDES et al., 2012).

No interior do silo, a atividade metabólica das bactérias pode variar de 2 a 6 semanas, dependendo de várias condições, mas principalmente em relação à presença do oxigênio na massa (PAHLOW et al., 2003). Alguns processos microbiológicos perduram durante longos períodos de estocagem, a exemplo da atividade metabólica das bactérias pertencentes à espécie *Lactobacillus buchneri*. Estas possuem a capacidade de permanecerem ativas, mesmo em condições de anaerobiose e baixo pH, o que é evidenciado pelo aumento da concentração de 1,2-propanodiol (KLEINSCHMIT; KUNG, 2006).

2.4 Bactérias ácido lácticas (BAL)

As bactérias ácido lácticas (BAL) são microrganismos que não possuem a enzima catalase (por isso não crescem em ambiente aeróbio) e são os principais microrganismos utilizados na composição de inoculantes bacterianos (LEHNINGER; NELSON; COX 2000). De acordo com o produto final formado a partir da glicose, as BAL podem ser divididas em

dois subgrupos: as homofermentativas que convertem a glicose em ácido láctico, pela rota Embden-Meyerhof e as heterofermentativas que formam ácido láctico, acético, etanol e CO₂.

A principal diferença entre as bactérias homoláticas e heteroláticas consiste, basicamente, na presença ou ausência da enzima aldolase (NARENDRANATH, 2003). Embora estas bactérias pertençam ao mesmo gênero, os seus produtos formados (ácidos orgânicos) possuem diferentes efeitos no processo de conservação da forragem, atuando como acidificantes do meio e também como agentes antimicrobianos.

A bactéria *L. plantarum* é a principal espécie pertencente ao grupo das homofermentativas, o qual converte um mol de carboidrato (e.g. glicose) em dois moles de ácido láctico e energia. Outras bactérias, a exemplo da *L. rhamnosus* também pertencem ao grupo das homofermentativas. Diferente de outros produtos formados, a produção do ácido láctico é o mais desejável durante o processo de fermentação da forragem, pois é mais eficiente em reduzir o pH no interior do silo devido a sua maior constante de ionização (Ka). Além disso, nesta via de fermentação não ocorre a produção do dióxido de carbono (CO₂), acarretando em uma recuperação de matéria seca de quase 100% da massa ensilada (McDONALD et al., 1991).

A inserção de microrganismos homoláticos durante a ensilagem garante um processo de fermentação mais intenso, por outro lado, o ácido láctico produzido não apresenta efeito sobre a estabilidade da silagem na etapa de desabastecimento do silo (DANNER et al., 2003). Por ser considerado um ácido forte (pKa = 3,86), este não possui atuação no controle de microrganismos que deterioram a silagem, uma vez que em ambientes com pH maior que seu valor de pKa, têm-se a rápida dissociação do ácido láctico em lactato e H⁺, reduzindo o pH do meio (KETCHUM, 1988).

O aumento da estabilidade aeróbia da silagem relaciona-se fortemente com o processo de deterioração, ou seja, com o controle da atividade metabólica de microrganismos deterioradores durante a abertura do silo. As BAL heterofermentativas, em especial as espécies *L. buchneri* possuem essa capacidade de inibição por produzirem o ácido acético como um dos seus produtos finais da fermentação.

O ácido acético é um ácido orgânico considerado fraco, com uma constante de dissociação baixa representada pelo seu pKa (4,73), e sua eficiência em controlar a atividade dos microrganismos varia tanto pela quantidade de íons H⁺ quanto pela ação do ácido não dissociado (LUES; THERON, 2012).

Existem diferentes teorias buscando explicar a inibição do crescimento dos microrganismos por ação dos ácidos orgânicos. No entanto, o mecanismo de ação mais

difundido e aceito é a denominada “teoria clássica de inibição dos ácidos orgânicos” proposto por Cramer et al. (1997) e Krebs et al. (1983) que relataram como mecanismo de ação a inibição de reações metabólicas devido a diminuição do pH interno da célula.

Esta teoria fundamenta-se no princípio de que o ácido não dissociado é formado por moléculas lipofílicas e são capazes de entrar no citoplasma da célula por difusão, através da membrana plasmática das células. Uma vez no citoplasma, com o pH próximo a 7, o ácido se dissocia em ânions carregados e prótons (McDONALD et al., 1991). Por estarem desprotonadas depois que entram da célula, não podem atravessar a bicamada lipídica e se acumulam no citoplasma, diminuindo assim o pH interno da célula (SALMOND; KROLL; BOOTH, 1984). Assim, a ação antimicrobiana do ácido dá-se provavelmente devido à acumulação de íons no interior da célula, o que é refletido na inibição do metabolismo celular, particularmente das enzimas glicolíticas (STRATFORD; ANSLOW, 1998; BRUL; COOTE, 1999).

Em relação às leveduras, os ácidos orgânicos apresentam, em geral, mecanismo de ação muito similar, sendo que, algumas espécies podem apresentar adaptações ao seu crescimento na presença dos ácidos orgânicos, reduzindo a ação destes quando se encontram no interior da célula (BEALES, 2004).

Em células adaptadas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bilii*, por exemplo, ocorre a expressão do gene denominado Pdr12 (Pdr – Pleiotropic Drug Resistance) existente na membrana plasmática das células microbianas, o qual é responsável pela extrusão do ânion RCOO^- após a dissociação do ácido no meio intracelular (PIPER et al., 2001). A presença do ácido no meio de crescimento aumenta a atividade da enzima H^+ -ATPase, o qual é codificada pelo gene PMA1, responsável por catalisar a extrusão do H^+ através da membrana plasmática, devido a diferença de potencial eletroquímico (PIPER et al., 2001). Células de *S. cerevisiae* e *Z. bilii* quando não adaptadas, permitem o acúmulo dos prótons H^+ e dos ânions RCOO^- no interior da célula, oriundos da dissociação do ácido.

O fato destas e outras espécies de leveduras apresentarem uma característica adaptativa em relação aos ácidos orgânicos, não garante que a mesma consiga se multiplicar na presença dos ácidos. Isto ocorre porque, mesmo em células adaptadas, a retirada tanto do próton quanto do ânion para o meio extracelular ocorre à custa de ATP, logo, tem-se o gasto de energia para que ocorra a manutenção do pH intracelular e não para o seu crescimento (ULLAH et al., 2012).

Os fungos filamentosos são microrganismos que podem ser submissos ao mesmo controle que ocorre em células de leveduras, como é o caso da ação do ácido acético sobre o

pH intracelular dos fungos (DANNER et al., 2003). O mecanismo de ação dos ácidos sobre o crescimento destes fungos, geralmente, não é considerado um processo dependente do pH, entretanto, sabe-se que o crescimento e a morfologia destes microrganismos pode ser influenciado pelo pH do meio (HIGGINS; BRINKHAUS, 1999).

Em se tratando da inoculação com cepas de bactérias heterofermentativas, estudos relatam que a inoculação de silagens com o *L. buchneri* pode acarretar na redução das concentrações de ácido láctico, ao mesmo tempo em que os teores de ácido acético e 1,2-propanodiol na silagem aumentam (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999; NISHINO et al., 2003). Oude Elferink et al. (2001) estudando a conversão do ácido láctico em ácido acético propuseram a seguinte via de fermentação em que, sob condições de anaerobiose, o *L. buchneri* é capaz de degradar 1 mol do ácido láctico em aproximadamente 0,5 mol de ácido acético, 0,5 mol de 1,2-propanodiol, 1 mol de CO₂ e traços de etanol (Figura 01).

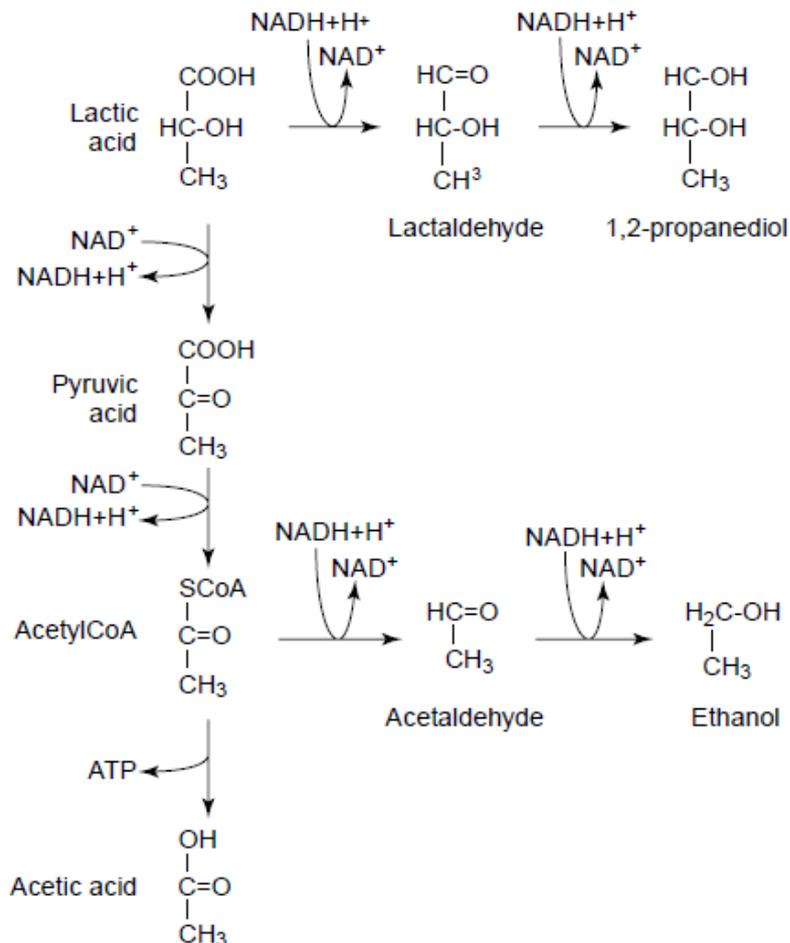


Figura 01 – Degradação anaeróbica do ácido láctico para ácido acético e 1,2-propanodiol por *Lactobacillus buchneri* (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Diferente dos ácidos orgânicos, o 1,2-propanodiol produzido durante a fermentação do ácido láctico pelo *L. buchneri* não apresenta efeito na estabilidade de silagem (DANNER et al., 2003). É sabido que o crescente acúmulo de 1,2-propanodiol na silagem ocorre devido o *L. buchneri* não ser capaz de degradar este álcool (OUDE ELFERINK et al., 2001), por outro lado, silagens de milho inoculadas com estas cepas podem ter como produto final de fermentação o 1-propanol, baixas concentrações de ácido propiônico e ausência de 1,2-propanodiol (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999). Isto sugere que outras espécies de bactérias estão envolvidas na degradação do 1,2-propanodiol. Diante disso, Krooneman et al. (2002) descobriram uma nova espécie de bactéria capaz de utilizar o 1,2-propanodiol como fonte de carbono sob condições anaeróbias, denominada *Lactobacillus diolivorans* (Figura 2).

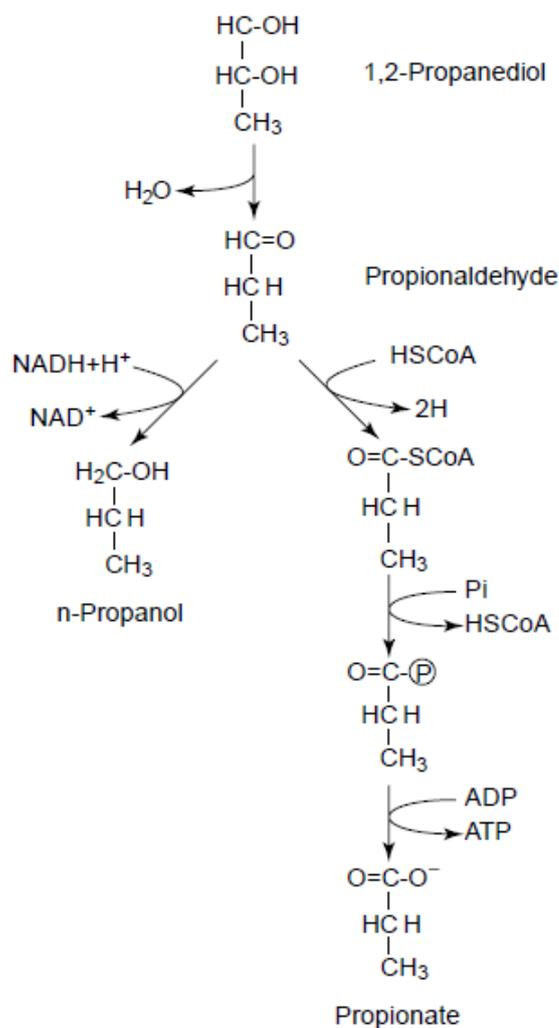


Figura 02 – Degradação anaeróbica do 1,2-propanodiol a ácido propiônico e 1-propanol pela *Lactobacillus diolivorans* (KROONEMAN et al., 2002).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. C. R. et al. Consumo, produção e composição do leite e do queijo de vacas leiteiras com níveis crescentes de ureia. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 20, n. 1, p. 37-42, 2013.
- BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 01-20, 2004.
- BERNARDES, T. F. et al. Produção e uso de silagens em fazendas leiteiras em três mesorregiões do Estado de Minas Gerais. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 56, n. 2, p. 133-138, 2013.
- BERNARDES, T. F.; O'KIELY, P. Deterioração aeróbia em silagens. In: REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. (Eds.) **Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. (1 ed). Jaboticabal: Maria de Lourdes. 2013. 714p.
- BERNARDES, T. F.; CARDOSO, M. V. S. B.; LIMA, L. M.. Silage feeding programs of intensive dairy farms. In: Annual Meeting of the American Dairy Science Association, 2., **Proceedings...**, Knoxville, 2018. p. 257.
- BOLSEN, K. K.; ASHBELL, G.; WEINBERG, Z. G. Silage fermentation and silage additives. **Australasian Journal of Animal Sciences - ASIAN**. v. 9, n. 5, p. 483-493, 1996.
- BORREANI, G. et al. Silage review: factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 3952-3979, 2018.
- BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in food: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**. v. 15, n. 50, p. 1-17, 1999.
- COUTINHO, F. S. et al. Perfil de degradação de amido de mandioca por *Saccharomyces cerevisiae* expressando uma amilase de *Cryptococcus flavus*. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. v. 2, n. 4, p. 15-21, 2013.
- CRAMER, J. A.; PRESTEGARD, J. H. NMR studies of pH-induced transport of carboxylic acids across phospholipids vesicles membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 75, n. 2, p. 295-301, 1977.
- DANIEL, J. L. P. et al. Alterações na qualidade de silagens de milho durante o armazenamento. In: JOBIM, C. C.; CECATO, U.; CANTO, M. W.; BANKUTI, F. I. (Eds.). **SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS**, 5., 2014. Maringá, **Anais...** Maringá, 2014. p. 23-36.
- DANNER, H. et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.1, p. 562-567, 2003.
- DER BEDROSIAN, M. C.; NESTOR, K. E.; KUNG JR, L. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 95, n. 9, p. 5115-5126, 2012.

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 yeasts growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**. v. 87, n. 4, p. 583-594, 1999.

DRIEHUIS, F. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. **Agricultural and Food Science**. v. 22, n. 1, p. 16-34, 2013.

FAVERDIN, P. et al. Grazeln: A model of herbage intake and milk production for grazing dairy cows. 1. Prediction of intake capacity, voluntary intake and milk production during lactation. **Grass and Forage Science**. v. 66, supl. (1), p. 29-44, 2011.

GOMES, M. S. et al. Avaliação de cultivares de milho para a produção de silagem: parâmetros genéticos e interação genótipos por ambientes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2002, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2002.

GONÇALVES, L. C.; BORGES, I.; FERREIRA, P. D. S. **Alimentação de gado de leite**. Ed. FEPMVZ, Belo Horizonte, 2009. 412p.

HIGGINS, C.; BRINKHAUS, F. Efficacy of several organic acids against molds. **The Journal of Applied Poultry Research**. v. 8, n. 4, p. 480-487, 1999.

KETCHUM, P. A. **Microbiology: concepts and applications**. New York: John Willey e Sons, 1988.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG JR, L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage during various stages of ensiling. **Journal of Dairy Science**. v. 89, n. 10, p. 3999-4004, 2006.

KREBS, H. et al. Studies on the mechanisms of the antifungal action of benzoate. **Biochemical Journal**. v. 214, n. 3, p. 657-663, 1983.

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

KUNG JR., L.; STOKES, M. R.; LIN C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2003. p. 251-304.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. Sao Paulo: Sarvier, 2000.

LUES, J. F.; THERON, M. M. Comparing organic acids and salt derivatives at antimicrobials against selected poultry-borne *Listeria monocytogenes* strains in vitro. **Foodborne Pathogens Diseases**. v. 9, n. 12, p. 1126-1129, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S. **Brock biology of microorganisms**. Ninth Edition, Prentice Hall, Inc. 2000.

McDONALD, P. et al. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK. 1991.

MOREIRA, C. Respiração. **Revista de Ciência Elementar**. v. 1, n. 1, 6p. 2013.

MUCK, R. E. A lactic acid bacterial strain to improve aerobic stability of silages. In **Research Summaries** (pp. 42-43). U.S. Dairy Forage Research Center (1996).

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

MUCK, R. E. et al. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, 2018.

NARENDRANATH, N. V. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol text book**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chapter 20, p. 287-298.

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

OLDENBURG, E. Mycotoxins in conserved forage. In: Pahlow G, Honig H, eds. Forage Conservation towards 2000, **Proceedings European Grassland Federation**. Landbauforschung Völkenrode Sonderheft 123. Braunschweig: Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode, 1991: 191-205.

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

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

PIPER, P. et al. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**. v. 147, n. 10, p. 2635-2642, 2001.

SALMOND, C.; KROLL, R. G.; BOOTH, I. R. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**. v. 130, n. 11, p. 2845-2850, 1984.

SCHOCKEN-ITURINO, R. P. et al. Alterações químicas e microbiológicas nas silagens de capim-Tifton 85 após a abertura dos silos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 34, n. 2, p. 464-471, 2005.

STRATFORD, M.; ANSLOW, P. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. **Letters in Applied Microbiology**. v. 27, n. 4, p. 203-206, 1998.

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

ULLAH, A. et al. Quantitative analysis of the modes of growth inhibition by weak organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 23, p. 8377-8387, 2012.

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

WEINBERG, Z. G. et al. Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silages. **Japanese Society of Grassland Science**. v.57, p.1-5, 2011.

WEISS, W. P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURES, 61., 1999, **Proceedings...**, Ithaca: Cornell University, 1999. p. 176-185.

WILKINSON, J. M.; DAVIES, D. R. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. **Grass and Forage Science**. v. 68, n. 1, 2012.

WOOLFORD, M. K.; BOLSEN, K. K.; PEART, L. A. Studies on the aerobic deterioration of whole-crop cereal silages. **Journal of Agricultural Science**. v. 98, n. 3, p. 529-535, 1982.

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

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 – USO DE ALIMENTOS CONSERVADOS EM DIETA DE VACAS EM LACTAÇÃO EM SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUÇÃO

RESUMO

Avaliações dos programas de alimentação atualmente utilizados nos rebanhos leiteiros de alta produção são importantes para identificar questões e práticas de manejo adequadas. O objetivo com este estudo foi conhecer a utilização de forragens nos programas nutricionais adotados pelos produtores em sistemas intensivos de produção leiteira. Um total de 145 fazendas foram entrevistadas de setembro de 2017 a janeiro 2018 por suas práticas de alimentação, entre os 6 maiores estados produtores de leite no Brasil (GO, MG, PR, RS, SC, SP). Os gerentes dos rebanhos e seus respectivos nutricionistas foram entrevistados utilizando um formulário de pesquisa comum. O formulário consistiu de 16 perguntas, incluindo informações das características do rebanho (n=5) e da dieta (n=11). Os dados foram tabulados em planilha do programa Microsoft Excel® e a média, desvio padrão, máximo, mínimo e a porcentagem de cada resposta foram calculados usando a ferramenta de fórmulas do próprio programa computacional. O número mínimo e máximo dos animais em lactação e da produção diária de leite variou de 26 para 2.020 e de 600 para 75,100 (L.d⁻¹) respectivamente. A relação forragem:concentrado variou de 36:64 para 80:20. A silagem de planta inteira de milho esteve em 100% das dietas, enquanto que a silagem de planta inteira de sorgo esteve em apenas 6,9% das dietas. Silagem de grão úmido, grão reconstituído e espigas eram usados por 24,8, 16,6 e 3,4% das propriedades, respectivamente. Silagem de grão reconstituído de sorgo era utilizada em 7,6% das dietas. Assim, mais da metade das propriedades (52,4%) adotavam uma silagem de grão (milho ou sorgo) na dieta. Sessenta e nove por cento das propriedades utilizavam uma ou mais segundas fontes de forragem na dieta. Feno, forragem fresca e pré-secado eram utilizadas por 45,5, 28,3 e 31,0% das propriedades, respectivamente. O Tifton-85 (*Cynodon*) foi a principal cultivar utilizada como feno (68,2%) e forragem fresca (37,8%) nas dietas pelos produtores. A cultura do azevém se destacou na forma de pré-secado em 56,1% das dietas avaliadas. No geral, o milho foi a cultura mais amplamente cultivada para silagem. A maioria das fazendas optou pelas silagens de grãos como fontes de grãos nas dietas.

Palavras-chave: Programa de alimentação de vacas. Silagem de grãos. Utilização de silagem.

ABSTRACT

Assessments of feeding programs currently utilized by high-producing dairy herds are important to identify issues and management practices. The aim of this study was to survey the use of forage in the feeding programs adopted by farms on intensive dairy production systems. One hundred and 45 farms were surveyed from september 2017 to january 2018 for their feeding practices, across the top 6 milk producing Brazilian states (GO, MG, PR, RS, SC, SP). Herd managers, and their respective nutritionists, were interviewed using a common survey form. The form consisted of 16 questions, including information on the characteristics of the herd (n=5) and diet (n=11). The data were tabulated in Microsoft Excel® spreadsheet and the mean, standard deviation, maximum, minimum and the percentages of each response were calculated using the formulas tool of the computer program itself. The minimum and maximum numbers of lactation cows and daily milk production ranged from 26 to 2,020 and from 600 to 75.100 (L.d⁻¹), respectively. The forage:concentrate ratio ranged from 36:64 to 80:20. The whole-plant corn silage was in 100% of the diets, while whole-plant sorghum silage was only 6.9% of the diets. High-moisture corn silage, reconstituted grain corn, and snaplage were used by 24.8, 16.6, and 3.4% of the farms, respectively. Reconstituted grain sorghum silage was used in 7.6% of the diets. Thus, more than half of the farms (52.4%) adopted grain silages (corn or sorghum) in the diet. Sixty-nine percent of the farms had one or more second forage source in the diets. Hay, fresh forage and haylage were used by 45.5, 31.0 and 28.3% of the farms, respectively. Tifton-85 (bermudagrass) was the main cultivar used like hay (68.2%) and fresh forage (37.8%) in the diets by farms. The ryegrass crop stands out as haylage form in 56.1% of the evaluated diets. Overall, corn was the most widely grown crop for silage. The majority of farms opted for grain silages as sources of grain in the diet.

Keywords: Cow feeding program. Grain silage. Silage utilization.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as regiões Sudeste e Sul são as principais áreas produtoras de leite no Brasil, onde o Estado de Minas Gerais é tido como o maior produtor de leite, representando 26,7% da produção total de leite no ano de 2016 (IBGE, 2016). Ainda que representem uma menor parcela das propriedades, fazendas leiteiras com sistemas intensivos de produção ainda são os principais responsáveis por contribuir na produção nacional de leite.

A silagem da planta inteira de milho é o principal alimento utilizado na dieta de vacas em lactação por ser uma importante fonte de energia e fibra e por seu valor nutritivo geralmente estar associado à participação de grãos na massa (BERNARDES et al., 2013; GONÇALVES; BORGES; FERREIRA, 2009). Logo, a busca por novas técnicas de manejo alimentar que visem aumentar a rentabilidade do sistema de produção é frequente pelos produtores.

O uso de animais mais exigentes em termos nutricionais e produtivos reforça a ideia de um refinamento nutricional e de manejo dentro das fazendas. Animais leiteiros de alta produção demandam uma alta exigência energética o qual é atendida durante o fornecimento das dietas. A silagem de grãos de milho (úmidos, reconstituídos e espigas) se encaixa nesse contexto, tendo em vista os benefícios nutricionais que esta apresenta, como por exemplo, a elevada disponibilidade e digestibilidade do amido (DANIEL et al., 2014).

Ainda que a participação do amido seja de grande importância na dieta de vacas de alta produção, as forragens são importantes em fornecer uma fibra necessária para estimular a mastigação, a ruminação e a saúde ruminal (WEISS, 1999). Outras opções de utilização de forragem conservada nas dietas incluem a adoção de feno e pré-secado, o qual difere do milho por serem importantes no fornecimento de fibra na dieta.

A inserção de alimentos de melhor valor nutritivo nas dietas é muito recorrente e as forragens conservadas atendem, de forma satisfatória, a demanda destes animais. Conhecer o tipo de dieta e os seus componentes pode proporcionar diferentes meios de melhorar a eficiência de um sistema de produção e direcionar novas linhas de pesquisa.

A avaliação dos programas de nutrição adotados pelos proprietários pode levar ao desenvolvimento de novas práticas de alimentação, bem como de novas tecnologias aos produtores. Diante disso, objetivou-se com o presente estudo conhecer a real utilização do uso de forragens nos programas de alimentação adotados pelos produtores nos sistemas intensivos de produção leiteira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O levantamento foi realizado no período de setembro de 2017 a janeiro de 2018, onde um total de 145 fazendas foram entrevistadas, em 6 estados brasileiros que lideram o rank de maiores estados produtores de leite no Brasil, segundo levantamento do IBGE, em 2017 (Figura 1). Produtores e nutricionistas que atuam dentro de sistemas intensivos de produção leiteira foram entrevistados, com o intuito de obter conhecimento sobre a participação e uso de forragens conservadas na dieta de vacas em lactação.



Figura 1 – Localização, por estado, das propriedades entrevistadas.

Foi aplicado um formulário eletrônico contendo um total de 16 perguntas, com informações referentes às características do rebanho leiteiro (n=5; número de vacas em lactação, raça, produção média diária de leite (L/d), produção média diária de leite (L/vaca/d) e relação forragem:concentrado), silagem de milho (n=4; planta inteira, grãos úmidos, grãos reconstituídos e espigas), silagem de sorgo (n=3; planta inteira, grãos úmidos e grãos reconstituídos), feno (n=1), pré-secado (n=1), forragem fresca (n=1), outras silagens (n=1).

Os dados obtidos foram tabulados em planilha do programa Microsoft Excel® e o cálculo das porcentagens de cada resposta foi realizado através da ferramenta de fórmulas do próprio programa computacional.

3 RESULTADOS

As características do rebanho das propriedades estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características do rebanho das propriedades entrevistadas.

Características	Variação
Número de animais em lactação	26 – 2.020
Produção média diária de leite (L/d)	600 – 75.100
Produção média diária de leite (L/vaca/d)	23 – 37
Relação forragem:concentrado	36:64 – 80:20
Raça predominante	Holandês

Entre as culturas utilizadas para produção de silagem, o milho se mostrou como a principal cultura a ser ensilada, presente em 100% das dietas, seguido da cultura do sorgo (Tabela 2). Em relação ao uso de silagens, é possível perceber que a utilização da silagem de planta inteira de milho foi muito mais expressiva do que as silagens de grãos como parte dos ingredientes nas dietas (Tabela 2).

Um pouco mais da metade das propriedades (59,3%) não usavam silagem de grãos de milho na dieta dos animais, ou seja, utilizavam unicamente a silagem de planta inteira. Contudo, 40,7% das propriedades adicionavam a silagem de grãos (úmido, reconstituído e espigas), em conjunto com a silagem de planta inteira. Esta associação se mostrou muito mais evidente para as silagens de grãos úmidos do que para a silagem de grãos reconstituídos de milho (Tabela 2).

A participação da silagem de planta inteira de sorgo se mostrou igual à de silagens de grãos nas dietas dos animais (Tabela 2). Dentre os tipos de silagens de grãos de sorgo, a silagem de grãos reconstituídos foi o mais utilizado na composição da dieta (6,9%), um cenário oposto ao uso de silagem de grãos úmidos, com menos de 1% de participação. Ainda segundo os dados obtidos, nenhuma propriedade usava apenas silagem de planta inteira de sorgo como única fonte de forragem na alimentação dos animais. Outras culturas como a aveia, azevém, cana-de-açúcar, capim tropical e cevada, também foram utilizadas para produção de silagem nos programas nutricionais das fazendas entrevistadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Principais culturas e tipos de silagens em dietas de vacas em lactação.

Cultura utilizada para silagem (n=145)	Nº propriedades	%
Milho	145	100,0
Sorgo	17	11,7
Outras culturas ¹	25	17,2
Tipo de silagem de milho		
Planta Inteira (n=145)		
Sim	145	100,0
Não	0	-
Silagem de grãos de milho (n=145)		
Sim	59	40,7
Não	86	59,3
Tipo de silagem de grãos de milho (n=145)		
Grão úmido	36	24,9
Grão reconstituído	23	15,8
Espiga	5	3,4
Tipo de silagem de sorgo		
Planta Inteira (n=145)		
Sim	10	6,9
Não	135	93,1
Silagem de grão de sorgo (n=145)		
Sim	10	6,9
Não	135	93,1
Tipo de silagem de grãos de sorgo (n=145)		
Grão úmido	1	0,7
Grão reconstituído	10	6,9

¹Cevada, aveia, azevém, cana-de-açúcar, capim-Mombaça, capim-Napier.

Nenhuma das propriedades entrevistadas afirmou utilizar silagem de milho (planta inteira e/ou grãos) sem a sua associação com uma segunda fonte de forragem, seja ela na forma conservada (feno ou pré-secado) ou não. Do total de propriedades entrevistadas, 69,6% destas afirmaram utilizar uma ou mais segunda fonte de forragem como parte dos ingredientes da dieta dos animais, onde as principais foram o feno, o pré-secado e o uso de forragem fresca (Tabela 3).

Entre as culturas utilizadas para a produção dessas segundas fontes, o capim Tifton-85, pertencente ao gênero *Cynodon*, foi a principal forragem utilizada para produção de feno e/ou também como forragem fresca, enquanto que a cultura do Azevém (*Lolium multiflorum*) foi a principal escolha para a produção de pré-secado (Tabela 3). Outras culturas também foram relatadas, mas pouco expressivas se comparadas com o capim Tifton-85 e o Azevém.

Tabela 3 – Principais segundas fontes de forragem e culturas utilizadas para sua produção pelas propriedades.

Uma ou mais segunda fonte de forragem na dieta (n=145)	Nº propriedades	%
Sim	101	69,6
Não	44	30,4
Principais segundas fontes de forragem		
Feno (n=145)		
Sim	66	45,5
Não	79	54,5
Pré-secado (n=145)		
Sim	40	27,6
Não	105	72,4
Forragem fresca (n=145)		
Sim	45	31,0
Não	100	69,0
Principais culturas utilizadas		
Azevém (n=145)		
Feno	12	8,3
Forragem fresca	9	6,2
Pré-secado	23	15,9
Tifton-85 (n=145)		
Feno e forragem fresca ¹	53	36,5
Feno	45	31,0
Forragem fresca	17	11,7
Pré-secado	15	10,3
Outras culturas ²	27	18,6

¹Total de propriedades que utilizavam ambas as culturas como segunda fonte de forragem, associadas ou não, nas dietas. ²Total de propriedades que não utilizavam azevém e tifton-85 na dieta, seja na forma conservada ou como forragem fresca, mas culturas como: aveia, alfafa, capins tropicais, cana-de-açúcar, entre outras.

O uso do capim Tifton-85 na forma de feno e/ou de forragem fresca esteve presente em todos os estados brasileiros abrangidos no levantamento, enquanto que o uso do pré-secado de Azevém se concentrava nos estados do PR, RS, SC e SP (Figuras 2a e 2b).

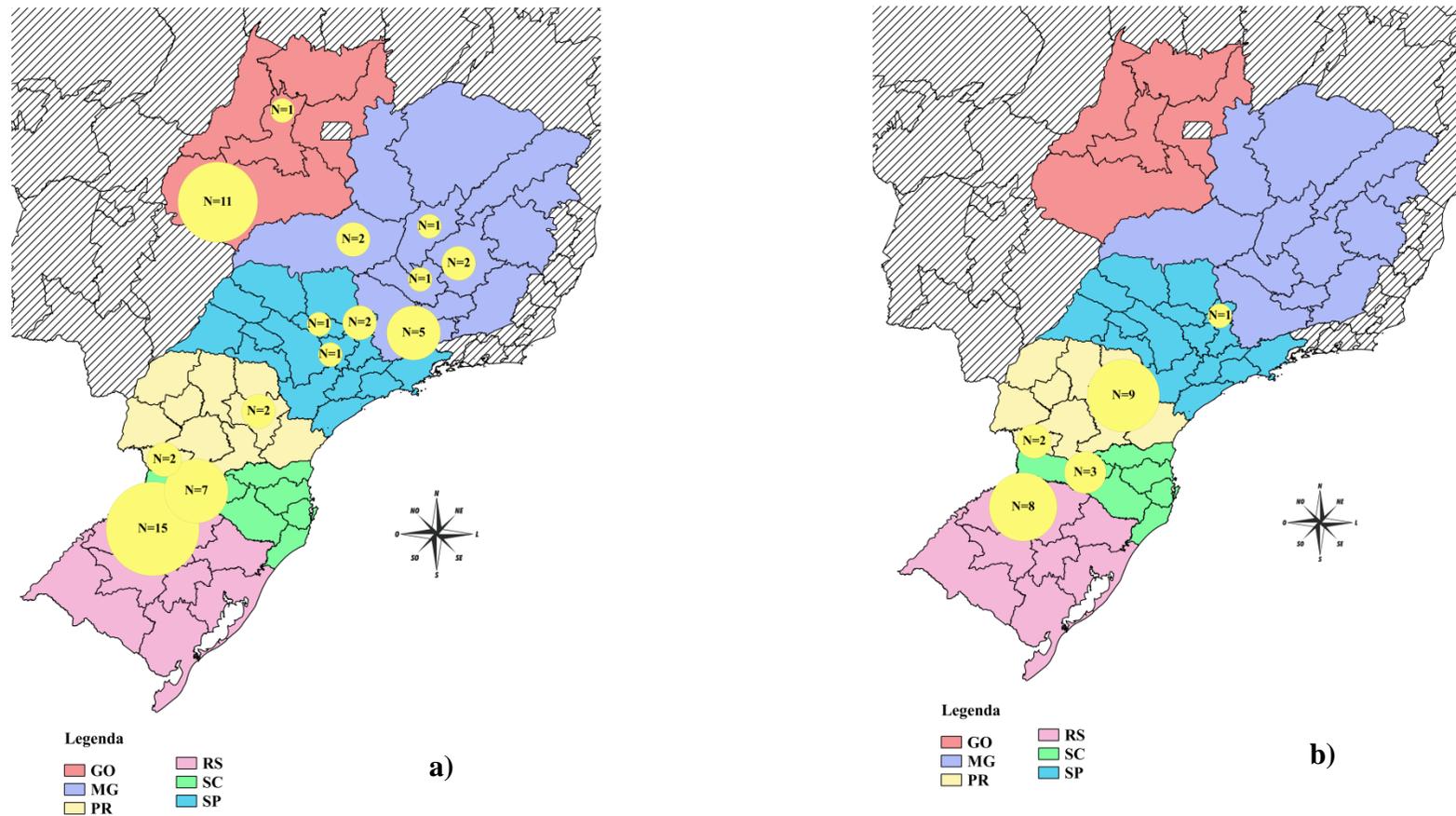


Figura 2 – Localização, por mesorregião, das propriedades que utilizavam a) Tifton-85 na produção de feno e/ou forragem fresca e b) Azevém na forma de pré-secado, em dietas de vacas em lactação.

Um ponto importante está na distribuição das propriedades que utilizavam forragens na forma conservada (silagem, feno e pré-secado) ou como forragem fresca na dieta dos animais, dentro de cada mesorregião dos estados abrangidos no presente levantamento (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de propriedades (%), por mesorregião, que utilizavam forragens na forma conservada (silagem, feno e pré-secado) e forragem fresca em dietas de vacas em lactação (continua).

Estado / Mesorregião ¹	Milho				Sorgo			Feno	Pré-secado	Forragem Fresca
	SPI ²	SGU ³	SGR ⁴	SE ⁵	SPI ²	SGU ³	SGR ⁴			
Goiás (n=145)										
Centro Goiano	2,8	-	0,7	-	1,4	-	-	0,7	-	2,8
Norte Goiano	0,7	-	-	-	0,7	-	0,7	-	-	0,7
Sul Goiano	11,7	2,8	0,7	1,4	0,7	-	0,7	6,2	-	6,9
Paraná (n=145)										
Centro-Oriental Paranaense	10,3	6,9	-	-	-	-	-	7,6	8,3	0,7
Sudoeste Paranaense	1,4	0,7	-	-	-	-	-	1,4	1,4	-
Rio Grande do Sul (n=145)										
Noroeste Rio-Grandense	22,1	3,4	-	-	-	-	-	11,7	10,3	4,8
Santa Catarina (n=145)										
Oeste Catarinense	6,2	3,4	0,7	-	-	-	-	5,5	2,8	0,7
Sul Catarinense	0,7	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-

¹As demais mesorregiões de cada estado que não apresentaram nenhuma das propriedades entrevistadas, foram excluídas durante a elaboração da tabela. ²SPI = Silagem de planta inteira; ³SGU = Silagem de grão úmido; ⁴SGR = Silagem de grão reconstituído; ⁵SE = Silagem de espigas.

Tabela 4 – Número de propriedades (%), por mesorregião, que utilizavam forragens na forma conservada (silagem, feno e pré-secado) e forragem fresca em dietas de vacas em lactação (conclusão).

Estado / Mesorregião ¹	Milho				Sorgo			Feno	Pré-secado	Forragem Fresca
	SPI ²	SGU ³	SGR ⁴	SE ⁵	SPI ²	SGU ³	SGR ⁴			
Minas Gerais (n=145)										
Campo das Vertentes	1,4	0,7	0,7	-	0,7	-	-	0,7	-	-
Central Mineira	0,7	-	0,7	-	-	-	-	0,7	-	-
Metropolitana de Belo Horizonte	1,4	-	-	-	-	-	-	1,4	-	1,4
Noroeste de Minas	2,1	-	0,7	0,7	-	-	-	-	-	-
Oeste de Minas	4,8	-	2,8	-	0,7	-	-	0,7	-	2,1
Sul/Sudoeste de Minas	16,6	4,1	3,4	-	2,1	0,7	0,7	2,8	1,4	6,9
Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba	13,1	2,1	4,8	0,7	-	-	4,8	2,8	0,7	1,4
São Paulo (n=145)										
Araraquara	0,7	0,7	0,7	-	0,7	-	-	0,7	0,7	0,7
Campinas	1,4	-	-	0,7	-	-	-	1,4	0,7	1,4
Piracicaba	0,7	-	-	-	-	-	-	0,7	0,7	-
Vale do Paraíba Paulista	1,4	-	-	-	-	-	-	-	0,7	0,7

¹As demais mesorregiões de cada estado que não apresentaram nenhuma das propriedades entrevistadas, foram excluídas durante a elaboração da tabela. ²SPI = Silagem de planta inteira; ³SGU = Silagem de grão úmido; ⁴SGR = Silagem de grão reconstituído; ⁵SE = Silagem de espigas.

4 DISCUSSÃO

A aplicação dos questionários revelou que existe uma faixa de variação muito grande entre as propriedades, no que se refere à caracterização dos rebanhos. O número de animais em lactação teve uma variação de quase 2.000 animais entre as propriedades (Tabela 1). Aliado a isso, observou-se que existe uma diferença de mais de 70.000 L/dia na produção de leite diária entre uma propriedade de menor e maior escala de produção, o que pode estar inteiramente relacionado ao quantitativo de animais no rebanho leiteiro de cada propriedade (Tabela 1).

Um grande quantitativo de animais no rebanho das propriedades contribui fortemente para a produção de leite nacional. Em se tratando de Brasil, o país ocupa a posição de quinto maior produtor de leite no mundo, atrás da União Europeia, Estados Unidos, Índia e China (IBGE, 2016). Sua posição de destaque não necessariamente está relacionada à produtividade dos animais, mais pelo grande número de cabeças, tendo o Brasil como o detentor do segundo maior efetivo de bovinos do mundo (23,7% do rebanho mundial), ficando atrás apenas da Índia (USDA, 2019).

Vale ressaltar que um maior número de animais na propriedade, não necessariamente implica em maior produção diária de leite. Condições de clima e de manejo da propriedade são fatores importantes que podem afetar a produtividade dos animais na propriedade, bem como características intrínsecas ao animal, como raça, peso e idade (SILVA et al., 2011; MELO et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017).

Com o presente levantamento verificou-se a ocorrência de possíveis semelhanças entre as propriedades como a predominância de animais da raça Holandesa no rebanho leiteiro (Tabela 1). Por ser uma raça bovina de grandes produções de leite, podendo apresentar desempenhos superiores a 50 kg de leite/vaca/dia e por apresentar longos períodos de lactação, a vaca Holandesa se destacou como a principal raça escolhida pelos produtores, principalmente nos estados das regiões Sul e Sudeste do Brasil.

Estas regiões são caracterizadas por apresentarem um clima mais ameno comparado às outras regiões do país. Segundo a classificação climática de Köppen (1936), ocorre a dominância da zona climática C em quase todo o território da região Sul e em pouco mais da metade da extensão territorial da região Sudeste do Brasil (Tabela 5). Por apresentarem características de clima subtropical e tropical/subtropical nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, respectivamente, isto permite uma melhor inserção de animais da raça Holandesa no gado

leiteiro, uma vez que são animais muito sensíveis às condições climáticas da região, podendo afetar seu desempenho (ALVARES et al., 2013; MELO et al., 2016).

Classificado como uma região com predominância da zona climática A (Tabela 5), a presença do gado Holandês no estado de Goiás se mostrou muito recorrente no presente levantamento. Ainda que o clima tropical possa interferir na produção de leite desses animais devido à ocorrência de elevadas temperaturas, a presença do gado Holandês muito provavelmente ocorreu em virtude do investimento em novos projetos leiteiros no estado, principalmente nas mesorregiões Sul e Centro Goiano, consolidando-o como o quarto maior produtor de leite do Brasil no ano de 2017 (IBGE, 2017).

Tabela 5 – Proporção da ocorrência de cada tipo de clima no estado de Goiás e nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, segundo a classificação de Köppen.

Região / Estado	km ²	%							
		Af	Am	Aw	As	Cfa	Cfb	Cwa	Cwb
Sul	576,410	-	0,1	0,2	-	70,3	29,4	-	-
Paraná	199,315	-	0,4	0,8	-	61,7	37,0	-	-
Rio Grande do Sul	281,749	-	-	-	-	86,7	13,3	-	-
Santa Catarina	95,346	-	-	-	-	40,1	59,9	-	-
Sudeste	924,511	0,7	1,1	35,1	7,8	10,7	5,0	21,7	17,9
Espírito Santo	46,078	2,9	14,3	53,3	-	14,9	10,4	0,8	3,3
Minas Gerais	586,528	-	-	34,9	12,3	0,5	0,7	25,5	26,0
Rio de Janeiro	43,696	2,1	5,3	44,1	-	14,3	9,4	17,9	6,9
São Paulo	248,209	1,9	0,5	30,8	-	33,4	12,6	17,4	3,4
Goiás	340,087	-	4,1	94,0	-	-	-	1,5	0,3

Fonte: Adaptado de ALVARES et al., 2013.

Outro fator importante dentro dos sistemas de produção intensivo está no manejo alimentar das propriedades, o que pode afetar diretamente o desempenho dos animais, principalmente aqueles de alta produção, como é o caso de vacas Holandesas. Percebeu-se que alguns dos programas nutricionais adotados nas propriedades trabalharam com inclusão máxima de 80% de forragem na dieta. Em contra partida, existe uma grande inclusão de alimentos concentrados na dieta dos animais, alcançando até 70% da participação destes na alimentação das vacas (Tabela 1).

É importante salientar que quando se formula uma dieta, a qualidade e a quantidade de forragem que será ofertada deve ser o primeiro componente a ter sua composição analisada, em termos de exigências nutricionais e de fibra nas dietas. A fibra é uma fonte importante de carboidratos utilizados pelos microrganismos do rúmen como fonte de energia, caracterizando

alimentos e limitando a adição de outros ingredientes na dieta, aumentando a relação forragem:concentrado (VAN SOEST, 1994). Paralelo a isso, as forragens utilizadas para este propósito garantem a saúde ruminal, através da atividade de mastigação e ruminação, em virtude da ação da fibra fisicamente efetiva no rúmen.

Por outro lado, o uso de concentrados também se tornou muito relevante como parte dos ingredientes que compõem a dieta. A alta inclusão de concentrados pode estar relacionada com a grande produção de grãos que existe, principalmente nas regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil, o que pode tornar vantajoso a inclusão desse tipo de alimento na dieta dos animais (LSPA, 2019). Aliado a isso, o uso de alimentos concentrados não apenas atendem a demanda nutricional dos animais, como também podem proporcionar um aumento quantitativo da produção de leite por animal, à medida que se diminui a relação forragem:concentrado (COSTA et al., 2011). De fato, animais mais produtivos (e.g. vacas Holandesas), consequentemente mais exigentes, necessitam de um aporte maior de nutrientes advindos da dieta com a maior participação de alimentos mais nutritivos em sua composição.

Uma característica comum entre as propriedades entrevistadas está na principal forma de forragem conservada utilizada na dieta das vacas: a silagem, onde a principal cultura utilizada é o milho, seguido do sorgo (Tabela 2). Esse cenário coincide com o levantamento realizado por Bernardes et al. (2013) e Bernardes e Rêgo (2014), onde o milho também foi ressaltado como a principal cultura destinada à produção de silagem pelos fazendeiros, bem como o sorgo como segunda cultura de grãos para produção de silagem. Bazotti, Nazareno e Sugamoto (2012) avaliando a caracterização socioeconômica e técnica da atividade leiteira do Paraná, também constataram que a cultura do milho é uma das principais culturas utilizadas para silagem, principalmente na mesorregião Centro-Oriental do estado, mas teve a cultura do milheto como a segunda cultura escolhida pelos produtores.

A escolha da cultura do milho, além de ser uma importante fonte de amido em dietas, fornece um alimento de alto valor nutritivo e de produção menos onerosa se comparado com o uso de concentrados na dieta, o que pode justificar o uso dessa forragem, como silagem, na alimentação animal. Outro fator que pode influenciar na escolha desta cultura também pode estar relacionado com as características que a planta apresenta no momento do corte para a produção de silagem, como MS, teor de carboidratos solúveis e capacidade tamponante, bem como por ser uma forragem bem adaptada às condições de clima tropical (ALLEN; COORS; ROTH, 2003).

Um ponto importante nas propriedades está na utilização de silagens de grãos na dieta dos animais. Considerando a participação das culturas do milho e do sorgo, 51% das

propriedades adotaram uma silagem de grãos como parte dos ingredientes da dieta, o que inclui as silagens de grãos úmidos e reconstituídos e, no caso do milho, silagem de espigas (Tabela 2).

A busca por novas técnicas que visem aumentar a rentabilidade do sistema de produção leiteira das propriedades é frequente pelos produtores. O uso de animais mais exigentes nas propriedades ressalta isso, onde a presença destes muito provavelmente acarretou na principal modificação desses sistemas de criação. Com isso, é comum que ocorra um ajuste no manejo alimentar nas propriedades através da busca por alimentos de melhor qualidade para compor a dieta de vacas de alta produção (e.g Holandesa), atendendo a alta demanda nutricional desses animais. A silagem de culturas produtoras de grãos (milho ou sorgo) se encaixa nesse contexto, através da conservação dos grãos da planta pelo processo de ensilagem.

A silagem de grãos de milho é uma das técnicas mais difundidas no setor produtivo em consequência da sua eficiência em conservar a matéria-prima utilizada na alimentação animal (GOBETTI et al., 2013). Vale ressaltar que a silagem de grãos, especificamente grãos úmidos de milho, ajudou a solucionar diversos problemas de armazenamento nas propriedades leiteiras, melhorando o seu valor nutritivo em dietas de vacas em lactação, o que pode ter contribuído para uma maior participação desse tipo de alimento conservado na alimentação animal.

A silagem de grãos úmidos foi ressaltada em todos os estados abrangidos no presente levantamento, onde a maior utilização deste tipo de alimento se concentra nas mesorregiões do Campo das Vertentes, Sul/Sudoeste de Minas e no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba no estado de Minas Gerais, e nas mesorregiões do Centro Oriental e Sudoeste Paranaense no estado do Paraná (Tabela 4). A silagem de grãos reconstituídos de milho, por sua vez, se concentra principalmente no estado de Minas Gerais, principalmente nas mesorregiões do Oeste de Minas, Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba e no Sul/Sudoeste de Minas (Tabela 4).

A silagem de espigas se mostrou pouco expressiva se comparada com os outros tipos de silagens de grãos (úmido e reconstituído), onde as propriedades que adotam esse tipo de alimento estão localizadas nas mesorregiões do Sul Goiano, Noroeste de Minas e Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba e em Campinas, nos estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo, respectivamente (Tabela 4). Vale ressaltar que, em se tratando de silagem de culturas produtoras de grãos, tem-se maior participação de amido altamente fermentável no rúmen, o

que muito provavelmente levou os produtores a adotar esse tipo de alimento na dieta, melhorando a eficiência alimentar dos animais e reduzindo custos na dieta.

De modo geral, o estado de Minas Gerais se mostrou como a região com o maior quantitativo de fazendeiros que utilizam a silagem de grãos de milho (úmido, reconstituído e espigas) nos programas nutricionais, seguido pelos estados do Paraná e Goiás (Tabela 4). Além da silagem de grãos, também foi relatado pelos fazendeiros o uso de outras fontes de forragem em conjunto com a silagem de planta inteira de milho, atuando como segundas fontes de forragem na alimentação animal.

O Brasil é um país que apresenta predominância da zona climática A em 81,4% do todo o seu território, caracterizando-o como um país de clima tropical segundo a classificação de Köppen, principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste do país (ALVARES et al., 2013). Isso faz com que o clima se torne um dos fatores limitantes para a produção de outras fontes de forragem, como o feno, em virtude da alta umidade e da alta incidência de chuvas, o que ressalta ainda mais a ensilagem como principal método de conservação de forragem utilizada pelos produtores (ADESOGAN, 2009; EVAGELISTA; LIMA, 2013).

De todo modo, a forragem conservada na forma de feno como uma segunda fonte de forragem na dieta de vacas em lactação se mostrou muito recorrente entre os fazendeiros (Tabela 3). As propriedades estão localizadas principalmente no estado do Rio Grande do Sul (Tabela 4), o que pode estar relacionado com a dominância do clima tipo Cfa neste estado, uma vez que o clima é fator primordial na produção de feno (ALVARES et al., 2013).

Historicamente, a utilização do feno no Brasil se iniciou com os criadores de cavalos que, até então, são os principais compradores desse tipo de produto. Contudo, Neres e Ames (2015) ressaltam que, em regiões onde o sistema de produção leiteira é a principal atividade pecuária, o feno vem sendo utilizado como uma segunda fonte de forragem em conjunto com a silagem na alimentação das vacas, o que pôde ser comprovado no presente estudo. Ainda segundo estes autores, os produtores de feno também estão buscando outras alternativas de produção de alimento nas fazendas, como é o caso do pré-secado.

A produção desse tipo de alimento apresenta como uma de suas vantagens o menor tempo de exposição ao sol em comparação ao feno, o que diminui os riscos com perdas do material colhido em virtude da precipitação da região. De fato, o uso do pré-secado na alimentação de vacas em lactação, mesmo que pouco expressivo, ainda se mostrou como uma

das escolhas pelos fazendeiros como segunda fonte de forragem na dieta, principalmente na região Sudeste do Brasil (Tabela 4).

A maior participação deste tipo de alimento esteve presente em propriedades localizadas nas mesorregiões do Noroeste Rio-Grandense, no Centro-Oriental Paranaense e no Oeste Catarinense, pertencentes aos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, respectivamente, ressaltando o Sul do Brasil como a principal região produtora de pré-secado (Tabela 4). Entretanto, observou-se que o uso de forragem fresca como segunda fonte de forragem nas dietas foi superior ao pré-secado (Tabela 3), especialmente na região Sudeste do Brasil, com maior utilização deste alimento em propriedades pertencentes à mesorregião Sul/Sudoeste de Minas (Tabela 4).

O período em que ocorreu a aplicação dos formulários pode ter contribuído com o presente resultado, já que o intervalo de tempo compreendido entre os meses de setembro e janeiro, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, são mais favoráveis ao crescimento das plantas, conseqüentemente, maior produção de forragem nas pastagens (TAFFAREL et al., 2016; FONTANELI et al., 2018). Aliado a isso, o uso de resíduos de origem animal (dejeito de suínos e esterco de animais, em geral) nas regiões Sudeste e também no Sul do Brasil, surgiu como alternativa para adubação orgânica em pastagens como potencial fertilizante com o fornecimento de nitrogênio e fósforo, aumentando a produtividade das pastagens (PEREIRA; NETO; NÓBREGA, 2013; NERES; AMES, 2015). Desse modo, a maior biomassa presente nas pastagens pode ter contribuído com o maior uso da forragem fresca como segunda fonte de forragem nas dietas, em relação ao pré-secado.

Uma das características que está relacionada com a alta produtividade das forragens refere-se à cultura utilizada na formação das pastagens. Os cultivares e os híbridos do gênero *Cynodon* têm recebido um bom destaque devido sua boa produtividade e valor nutritivo considerado elevado (EVANGELISTA; LIMA, 2013). Uma das espécies mais utilizadas para esta finalidade está o capim Tifton-85, segundo Neres e Ames (2015), o que coincide com os resultados do presente levantamento (Tabela 3), podendo considerar esta espécie como de duplo propósito na alimentação animal: seja como forragem conservada na forma de feno (também como pré-secado) ou como forragem fresca.

O capim Tifton-85 esteve presente em todos os estados brasileiros abrangidos pelo levantamento com destaque para a região Sul, onde apresentou o maior quantitativo de fazendas que utilizavam esta cultura como feno e/ou forragem fresca (Figura 2a). Nesta região, o número de propriedades no Rio Grande do Sul foi superior em comparação aos

estados do Paraná e Santa Catarina (Figura 2a). É importante destacar que as propriedades no estado do Rio Grande do Sul estiveram concentradas somente na mesorregião Noroeste do Rio-Grandense, destacando a predominância do capim Tifton-85 nesta região. Além disso, esta mesorregião, sozinha, apresentou um total de propriedades superior ao estado de Goiás e toda a região Sudeste do Brasil (Figura 2a).

O capim *Cynodon* é uma espécie forrageira que apresenta estacionalidade de produção, reduzindo sua produtividade nas épocas mais frias do ano, o que pode ser suprimido com a implantação de forrageiras de clima frio. Hahn et al. (2015) ressaltam que o Azevém é umas das principais forrageiras de clima temperado utilizadas para produção de forragem, principalmente durante a estação fria do ano. Isso se mostra de acordo com o presente levantamento onde o a cultura do Azevém foi ressaltada como a principal cultura de clima frio utilizada pelos fazendeiros como segunda fonte de forragem.

Apesar de existir a possibilidade desta cultura ser utilizada também como forragem fresca, foi na forma conservada como pré-secado que ocorreu a maior participação deste tipo de alimento na dieta dos animais, com predominância quase que exclusivamente na região Sul do Brasil (Figura 2b). Entre os estados desta região, o Paraná contou com um total de 11 propriedades que utilizam o pré-secado de Azevém na alimentação das vacas, distribuídas nas mesorregiões Centro-Oriental Paranaense e Sudoeste Paranaense, enquanto que o estado de Santa Catarina contou com a participação de apenas 3 propriedades (Figura 2b).

5 CONCLUSÃO

O uso de alimentos conservados na dieta de vacas em lactação foi muito recorrente entre os produtores, principalmente silagem de planta inteira de milho, associada a uma segunda fonte de forragem. O feno foi muito comum entre os produtores como segunda fonte de forragem, seguido da forragem fresca e do pré-secado. Contudo, é possível perceber uma leve tendência em substituir a forragem fresca pelo pré-secado como alimento conservado nas dietas. A silagem de grãos é uma realidade em pouco mais da metade das propriedades, mas que também revelou uma tendência em aumentar a participação desse alimento conservado nas dietas, o que garante benefícios no sistema de produção leiteira.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A. T. Challenges of tropical silage production. XV International Silage Conference. **Proceedings...** University of Wisconsin, Madison, WI, 139-154, 2009.
- ALLEN, M. S.; COORS, J. G.; ROTH, G. W. Corn silage. In: BUXTON, R.; MUCK, R. E. HARRISON, J. H. (Eds.). **Silage Science and Technology**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 2003. p. 547-608. (Series Agronomy, 42).
- ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**. v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- BAZOTTI, A.; NAZARENO, L. R.; SUGAMOSTO, M. Caracterização socioeconômica e técnica da atividade leiteira no Paraná. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**. Curitiba, v. 33, n.123, p. 213-234, 2012.
- BERNARDES, T. F. et al. Produção e uso de silagens em fazendas leiteiras em três mesorregiões do Estado de Minas Gerais. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 56, n. 2, p. 133-138, 2013.
- BERNARDES, T. F.; RÊGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**. v. 97, n. 3, p. 1852-1861, 2014.
- COSTA, L. T. et al. Análise econômica da adição de níveis crescentes de concentrado em dietas para vacas leiteiras mestiças alimentadas com cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 40, n. 5, p. 1155-1162, 2011.
- DANIEL, J. L. P. et al. Alterações na qualidade de silagens de milho durante o armazenamento. In: JOBIM, C. C.; CECATO, U.; CANTO, M. W.; BANKUTI, F. I. (eds.). **SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS**, 5., 2014. Maringá, **Anais...** Maringá, 2014. p. 23-36.
- EVANGELISTA, A. R.; LIMA, J. A. Produção de feno. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 34, n. 277, p. 43-52, 2013.
- FONTANELI, R. S. et al. Produção de alimentos no inverno para alimentação de vacas leiteiras. **Revista Plantio Direto & Tecnologia Agrícola**. Ed. 162, 2018. Disponível em: <https://www.plantiodireto.com.br/edicoes>
- GOBETTI, S. T. C. et al. Utilização de silagem de grão úmido na dieta de animais ruminantes. **Revista Ambiente Guarapuava**. Paraná, v. 9, n. 1, 225-239, 2013.
- GONÇALVES, L. C.; BORGES, I. FERREIRA, P. D. S. **Alimentação de gado de leite**. Ed. FEPMVZ, Belo Horizonte, 2009. 412p
- HAHN, L. et al. Gramíneas forrageiras anuais de inverno em cultivo estreme e em sobressemeadura em Tifton-85. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, v. 11, n. 21, p. 1159-1169, 2015.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 44, p. 1-51, 2016. Disponível em:
<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 45, p. 1-8, 2017. Disponível em:
<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>

KÖPPEN, W. Das geographische System der Klimate. In: KÖPPEN, W.; GEIGER, R. (Eds.): **Handbuch der Klimatologie**. Gebrüder Bornträger, Berlin, 1, 1-44, part C, 1936.

Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA. **Área e produção de Cereais, Leguminosas e Oleaginosas – Brasil, Grandes Regiões e Unidades de Federação**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em:
<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html.?=&t=resultados>

MELO, A. F. et al. Efeitos do estresse térmico na produção de vacas leiteiras: revisão. **PUBVET**. Maringá, v. 10, n. 10, p. 721-730, 2016.

NASCIMENTO, S. T. et al. Influência da temperatura ambiente no verão na produção de leite de vacas Holandesas. **PUBVET**. Maringá, v. 11, n. 3, p. 217-223, 2017.

NERES, M. A.; AMES, J. P. Novos aspectos relacionados à produção de feno no Brasil. **Scientia Agraria Paranaensis**. Paraná, v. 14, n.1, p. 10-17, 2015.

PEREIRA, D. C.; NETO, A. W.; NÓBREGA, L. H. B. Adubação orgânica e algumas aplicações agrícolas. **Revista Varia Scientia Agrárias**. Paraná, v. 3, n. 2, p. 159-174, 2013.

SILVA, D. A. R. et al. Produção de leite de vacas da raça Holandesa de pequeno, médio e grande porte. **Revista Ciência Rural**. Santa Maria, v. 41, n. 3, p. 501-506, 2011.

TAFFAREL, L. E. et al. Características estruturais e composição bromatológica de capim tifton 85 sob doses de nitrogênio e idades de rebrota. **Semina: Ciência Agrárias**. Londrina, v. 37, n. 4, p. 2067-2083, 2016.

United States Department of Agriculture – USDA. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Foreign Agricultural Service. April, 9, 2019. Disponível em:
<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/downloads>

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of Ruminants**. Comstock Publ. Assoc. Ithaca, 1994. 476p.

WEISS, W. P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURES, 61., 1999, **Proceedings...**, Ithaca: Cornell University, 1999. p. 176-185.

ARTIGO 2 – EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE *Lactobacillus buchneri* e *Lactobacillus diolivorans* SOBRE A ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE MILHO

RESUMO

Silagem de planta inteira de milho é um alimento com bom valor nutritivo, porém muito susceptível ao processo de deterioração aeróbia. O uso de inoculantes bacterianos pode inibir o crescimento de microrganismos deterioradores, melhorando a estabilidade aeróbia da silagem. Objetivou-se com o presente estudo determinar o efeito da inoculação e do tempo de estocagem no perfil fermentativo, contagem de microrganismos, deterioração aeróbia e estabilidade aeróbia de silagens de planta inteira de milho. Os tratamentos foram silagem de milho sem inoculante (CONTROL), silagem de milho inoculada com associação entre *L. plantarum* DSM 12837, *L. rhamnosus* NCIMB 30121 e *L. buchneri* DSM 12856 (C1), e silagem de milho inoculada com associação entre *L. rhamnosus* NICMB 30121, *L. buchneri* DSM 12856 e *L. diolivorans* DSM 32074 (C2), estocadas durante 15, 30, 45 e 90 dias. A dosagem do inoculante foi de $2,5 \times 10^5$ log UFC.g⁻¹ de massa verde. Foi compactado, em média, 2,900 kg de forragem em silos experimentais, alcançando uma densidade de $574,92 \pm 6,80$ kg.m⁻³, aproximadamente. As variáveis MS, pH, produtos finais da fermentação e contagem de microrganismos das silagens foram avaliadas. As silagens foram submetidas a um teste de deterioração e estabilidade aeróbia por 10 dias. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com um arranjo fatorial 3x4, com quatro repetições. As variáveis foram analisadas utilizando o procedimento PROC GLM do SAS (SAS Institute). As médias foram comparadas pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. O tempo de estocagem reduziu o teor de MS ($P < 0,0001$) em 3,8% entre as silagens estocadas por 30 e 90 dias de ensilagem. O pH foi afetado pela interação inoculação x tempo de estocagem ($P = 0,0103$), sendo menor com o aumento da estocagem e com a inoculação. A inoculação ($P = 0,010$) e o tempo de estocagem ($P = 0,010$) reduziu a contagem de leveduras. A contagem de fungos filamentosos foi afetada pela inoculação ($P = 0,0014$), sendo maior nas silagens CONTROL. A contagem de BAL foi afetada pela interação inoculação x tempo de estocagem ($P < 0,0001$), com maior contagem nas silagens C1 e C2. O tempo de estocagem elevou a concentração de ácido láctico ($P < 0,0001$) de 5,66 para 6,36% na MS, de 30 para 45 dias de estocagem. A concentração de ácido acético e as perdas na deterioração aeróbia foram afetadas pela inoculação ($P < 0,05$) e pelo tempo de estocagem ($P < 0,05$). As concentrações de ácido propiônico, 1,2-propanodiol e etanol, estabilidade e deterioração aeróbia foram afetadas pela interação inoculação x tempo de estocagem ($P < 0,05$). As concentrações de ácido propiônico e 1,2-propanodiol foram maiores e menores com 45 e 90 dias de ensilagem, respectivamente, na silagem C2. O teor de etanol e a deterioração aeróbia foram maiores na silagem CONTROL. As silagens inoculadas obtiveram um aumento na estabilidade aeróbia de, aproximadamente, 23, 31 e 115 horas quando estocadas por 30, 45 e 90 dias, respectivamente. Silagens inoculadas e estocadas por 45 dias obtiveram estabilidade aeróbia superior às silagens CONTROL armazenadas por 90 dias.

Palavras-chave: Estabilidade aeróbia. Inoculante bacteriano. Silagem de milho.

ABSTRACT

Whole-plant corn silage is a feed with high nutritive value, however, it is very susceptible to aerobic deterioration. The use of bacterial inoculants can inhibit the growth of spoilage microorganisms, improving the aerobic stability of silage. The objective of this study was to determine the effect of inoculation and storage time on fermentation profile, microbial counts, aerobic deterioration and aerobic stability of whole-plant corn silage. The treatments were corn silage without inoculant (CONTROL), inoculated corn silage with association of *L. plantarum* DSM 12837, *L. rhamnosus* NCIMB 30121 e *L. buchneri* DSM 12856 (C1), and inoculated corn silage with association of *L. rhamnosus* NCIMB 30121, *L. buchneri* DSM 12856 and *L. diolivorans* DSM 32074 (C2), stored for 15, 30, 45 and 90 days. The inoculant dosage was 2.5×10^5 log CFU.g⁻¹ of green mass. An average of 2.900 kg of forage was packed in experimental silos (5 L), achieving a density of 574.92 ± 6.80 kg.m⁻³, approximately. Dry matter, pH, fermentation end-products and microorganisms counts of silages were evaluated. The silages were subjected to an aerobic stability and deterioration assay for 10 days. A completely randomized design was used, with a 3x4 factorial arrangement, with four replications. Variables were analyzed with the PROC GLM procedure of the SAS (SAS Institute). The means were compared by Student's t-test at 5% level. The storage time reduced DM content ($P < 0.0001$) in 3.8% among silages with 30 and 90 days of ensiling. The pH was affected by interaction inoculation x storage time ($P = 0.0103$), being lower with the increase of storage time and inoculation. The inoculation ($P = 0.010$) and storage time ($P = 0.010$) reduced yeast counts. The mold counts were affected by inoculation ($P = 0.0014$), being higher in CONTROL silages. The LAB counts were affected by interaction inoculation x storage time ($P < 0.0001$), with higher counts in C1 and C2 silages. The storage time increased lactic acid concentration ($P < 0.0001$) from 5.66 to 6.36% DM, from 30 to 45 days of ensiling. Acetic acid concentration and deterioration process losses were affected by inoculation ($P < 0.05$) and storage time ($P < 0.05$). Propionic acid, 1,2-propanediol and ethanol concentration, aerobic stability and deterioration were affected by inoculation x storage time ($P < 0.05$). Propionic acid and 1,2-propanediol concentrations were higher and lower with 45 and 90 days of ensiling, respectively, in C2 silage. The ethanol content and aerobic deterioration were higher in CONTROL silage. Inoculated silages had an increase on aerobic stability about 23, 31 and 115 hours when stored for 30, 45 and 90 days, respectively. Inoculated silages and stored for 45 days obtained higher aerobic stability in compare to CONTROL silages stored for 90 days.

Keywords: Aerobic stability. Bacterial inoculants. Corn silage.

1 INTRODUÇÃO

A presença do ar atmosférico na massa é o principal responsável pelo início do processo de deterioração, em virtude da atividade de microrganismos deterioradores aeróbios, em geral, leveduras e fungos filamentosos (PAHLOW et al., 2003). Silagens que apresentam um processo fermentativo adequado (alta concentração de ácido lático e carboidratos solúveis residuais), como a silagem de milho, se tornam mais susceptíveis à deterioração (BERNARDES et al., 2012).

As leveduras possuem a habilidade de utilizar o ácido lático como substrato para o seu metabolismo, aumentando o pH e a temperatura da silagem (PAHLOW et al., 2003). Uma alternativa que pode reduzir a intensidade de deterioração desse alimento é através do controle da ação dos microrganismos deterioradores com o uso de inoculantes bacterianos que possuem via de fermentação heterolática (MUCK et al., 2018).

As BAL heterofermentativas (e.g. *Lactobacillus buchneri*) tem como um dos produtos finais o ácido acético, o qual é extremamente eficaz no controle dos microrganismos deterioradores (McCDONALD et al., 1991). A formação deste ácido pode ocorrer pela assimilação tanto de carboidratos como pelo ácido lático, formando ácido acético e 1,2-propanodiol como alguns dos produtos finais da fermentação, este último sem possuir efeitos antimicrobianos (OUDE ELFERINK et al., 2001; DANNER et al., 2003).

Contudo, ainda que a produção deste ácido ocorra nos primeiros dias de estocagem (14 dias), este ainda se encontra em concentrações muito baixas para apresentar algum efeito satisfatório no que se refere à estabilidade aeróbia de silagens (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999). Ainda que o processo de fermentação se estabeleça com até 6 semanas de estocagem (PAHLOW et al., 2003), não existe uma boa conciliação entre o tempo necessário para estabilização da fermentação com um maior tempo de estabilidade das silagens. Logo, fazer a abertura de silos mais cedo pode ocasionar em silagens mais propensas ao processo de deterioração, tornando-se um desafio aos produtores quando ocorrem, por exemplo, erros de planejamento na propriedade (DANIEL et al. 2014).

Algumas bactérias possuem a habilidade de utilizar o 1,2-propanodiol, derivado da fermentação das *L. buchneri*, como substrato para seu metabolismo, como é o caso da *Lactobacillus diolivorans*. Estas bactérias são capazes de metabolizar o 1,2-propanodiol e formar 1-propanol e ácido propiônico como produtos finais da fermentação (KROONEMAN et al., 2002). Assim como o ácido acético, o ácido propiônico também é capaz de inibir o

crescimento de leveduras e fungos filamentos durante o desabastecimento do silo (MUCK et al, 2018).

Assim, o aumento da concentração de ácidos fracos capazes de controlar a intensidade de deterioração na massa ensilada pode fornecer silagens mais estáveis, sem a necessidade de longos períodos de estocagem. Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo determinar o efeito da inoculação e do tempo de estocagem no perfil fermentativo, contagem de microrganismos, deterioração aeróbia e estabilidade aeróbia de silagens de planta inteira de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das silagens e tratamentos

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia na Universidade Federal de Lavras, Brasil (21°13'49" S, 44°58'10" W). O milho foi obtido em fazenda comercial e a colheita da planta inteira foi realizada no dia 18 de junho, com colhedora automotriz, quando a planta atingiu entre 30 – 35% de MS. As silagens foram preparadas na própria fazenda, em área coberta, longe de qualquer possível fonte de contaminação.

Os tratamentos incluíram silagem de milho sem aditivo (CONTROL), silagem de milho inoculada com um combo de BAL, composto pelas cepas *L. plantarum* DSM 12837, *L. rhamnosus* NCIMB 30121 e *L. buchneri* DSM 12856 (C1), e silagem de milho inoculada com outro combo de BAL, composto pelas cepas *L. rhamnosus* NICMB 30121, *L. buchneri* DSM 12856 e *L. diolivorans* DSM 32074 (C2), onde as silagens confeccionadas permaneceram estocadas durante 15, 30, 45 e 90 dias.

A aplicação dos inoculantes foi realizada logo após a colheita e picagem do milho, antes das silagens serem confeccionadas. A dosagem aplicada foi de $2,5 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ de massa verde, onde foi realizada uma pré-diluição do produto adicionando 600 mL de água em 100 g de inoculante. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 0,9 mL do inoculante pré-diluído e adicionado em 2 litros de água e, então, aplicado na forragem picada.

A quantidade de milho inoculado foi de 150 kg por tratamento e a aplicação do inoculante foi realizada por pulverização e posterior homogeneização da massa de forma manual. A silagem CONTROL, por sua vez, recebeu a mesma quantidade de água e foram coletadas duas amostras de cada tratamento, antes da massa de forragem ser compactada.

Após a aplicação dos tratamentos, foi compactado, em média, 2,900 kg de forragem em silos experimentais com capacidade de 5 litros, alcançando uma densidade média de $574,92 \pm 6,80 \text{ kg.m}^{-3}$. Foram preparados quatro repetições para cada tratamento. A compactação foi realizada de forma manual onde os silos experimentais foram vedados com silicone e, por fim, pesados. Passado o tempo de estocagem, os silos foram pesados e abertos. A camada superficial com sinais de deterioração de cada unidade experimental foi completamente removida e descartada e a silagem remanescente foi retirada e homogeneizada.

As concentrações de MS, perfil fermentativo, produtos finais da fermentação e contagem de microrganismos foram determinados em duplicata para cada amostra de silagem coletada. As silagens foram submetidas a um teste de estabilidade e deterioração aeróbia. Foi utilizado 1 kg de silagem para cada unidade experimental, permanecendo expostas ao ar durante 10 dias, em temperatura ambiente (26 °C).

Uma folha de alumínio foi colocada em cada silo experimental para reduzir a perda excessiva de umidade e possíveis contaminações por elementos externos. A temperatura, tanto da sala quanto das silagens, foi registrada a cada 15 minutos por meio de dataloggers, sendo 1 para cada balde e 3 para o ambiente. A estabilidade aeróbia foi definida como o tempo total, em horas, em que a silagem permaneceu estável antes de atingir uma temperatura de 2 °C acima da temperatura ambiente (MORAN et al., 1996). A deterioração aeróbia das silagens foi definida como o somatório da temperatura acumulada, em °C, a partir do momento em que houve a quebra da estabilidade das silagens (CONAGHAN; O'KIELY; O'MARA, 2010).

Análises e preparo das amostras

O material pré-ensilado e as silagens foram divididas em duas subamostras. Uma subamostra foi pré-seca em estufa com circulação forçada de ar a 55 – 60°C por 72 horas para determinação da concentração de MS. Após secagem, uma subamostra foi pesada e moída em moinho de facas tipo Willey, com peneira de 1mm.

Para caracterização do material pré-ensilado, a amostra moída foi analisada para nitrogênio total (PB = nitrogênio total x 6,25) pelo método de Kjeldhal, de acordo com a AOAC (1990). Para determinação do teor de fibra em detergente neutro (FDN), a amostra foi tratada com α -amilase termoestável, de acordo com Mertens (2002). Para concentração de cinzas, a amostra foi queimada em mufla a 600°C, por 4 horas (AOAC, 1990) e o teor de amido pelo método de Hall e Mertens (2008).

A segunda subamostra do material pré-ensilado e das silagens foram armazenadas como amostras úmidas em freezer a -30°C . Na determinação dos valores de pH, foi retirado um extrato aquoso de cada amostra e feito a leitura em um potenciômetro (HI 2221, Hanna Instruments), utilizando um aparelho multiparâmetro (A214 pH / ISE Thermo Scientific Orion Star). Para obter o extrato aquoso, foram pesados 30 g de amostra e adicionados 270 mL de água destilada, homogeneizados durante 4 minutos, a 200 rpm, em um homogeneizador (Stomacher 400, Seward, London, UK), e então filtrados 50 mL do extrato aquoso para realizar a leitura do pH de cada amostra.

Na determinação dos produtos finais da fermentação, foram retirados 2 ml de amostra obtida a partir do extrato aquoso, onde foram centrifugadas, filtradas e injetadas em cromatógrafo de fase líquida de alta precisão (Shimadzu LC- 10Ai; Shimadzu Corp. Tokyo, Japão). Foram realizadas duas centrifugações de 10 minutos cada, a 10.000 rpm, a 4°C . Os ácidos foram detectados pela absorvância do UV (210nm), e os álcoois foram identificados usando o detector de índice de refração (RID; 10ASPD-10Ai). O aparelho foi equipado com uma coluna de exclusão de íon (SUPELCO –SUPELCOGEL 8H-5cm-4,8mm) 28 operado a 30°C com um fluxo de corrida de 0,5 ml/min com fase móvel água e ácido sulfúrico 0,005M.

A contagem de microrganismos (fungos filamentosos, leveduras e bactérias lácticas) foi realizada a partir do extrato aquoso obtido pela homogeneização de 30 g de amostra com 270 mL de água peptonada, agitada em um aparelho homogeneizador (Stomacher 400, Seward, London, UK) por 4 minutos, a 200 rpm. Foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície para contagem dos microrganismos. Como meio de cultura para a contagem de fungos filamentosos e leveduras foi utilizado o meio YGC Agar (Fluka, Sigma Aldrich Química Brasil LTDA) e foram preparadas diluições em séries de 10^{-1} a 10^{-4} em duplicata (TABACCO et al., 2009).

As placas permaneceram em uma câmara de germinação, a 28°C , durante três e cinco dias para as contagens de leveduras e fungos filamentosos, respectivamente. Para a contagem de bactérias lácticas, foi utilizado o meio de cultura MRS Agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE, Merck KGaA) juntamente com um agente antifúngico (nistatina), na relação de 4 mL por litro de meio de cultura, onde foram preparadas diluições em séries de 10^{-3} a 10^{-7} , também em duplicata (TABACCO et al., 2009). As placas permaneceram em estufa, a 37°C , durante três dias para a contagem das bactérias. As colônias foram contadas com base nas suas características macromorfológicas.

As perdas de matéria seca ocorridas no processo de fermentação foram calculadas por diferença entre o peso do material colocado em cada silo na ensilagem e o peso dessas silagens no momento de abertura.

Análise estatística

Os dados de contagem de microrganismos foram transformados em \log_{10} . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em fatorial 3x4, com doze tratamentos e quatro repetições, totalizando 48 unidades experimentais. Os dados foram analisados utilizando o PROC GLM do programa estatístico SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute, 2001). As médias dos tratamentos foram estimadas pelo “LSMEANS” e a comparação foi realizada pelo teste t de Student a 5% de probabilidade, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + I_i + T_j + (I \times T)_{ij} + e_{ijk}$$

Sendo,

Y_{ijk} = valor da variável referente à repetição que recebeu o inoculante i no tempo de estocagem j;

μ = média geral;

I_i = efeito fixo do inoculante i, para i = 1, 2, 3;

T_j = efeito fixo do tempo de estocagem j, para j = 1, 2, 3, 4;

T tempo_{ij} = efeito da interação entre o inoculante i no tempo de estocagem j;

e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação Y_{ijk} .

3 RESULTADOS

As características da planta no momento da ensilagem estão demonstradas na Tabela 1. Os teores de MS, pH, contagem de microrganismos e produtos finais da fermentação estão apresentados na Tabela 2. No momento da abertura dos silos, o teor de matéria seca das silagens reduziu de 33,5 para 29,7%, à medida que o tempo de estocagem aumentou ($P < 0,0001$), representando um decréscimo de 3,8% na MS quando as silagens foram estocadas até 90 dias (Tabela 2). Observou-se que a adição de inoculantes no momento da ensilagem não afetou o teor de matéria seca das silagens ($P = 0,9379$).

Tabela 1 – Composição química e perfil de microrganismos da planta inteira de milho no momento da ensilagem.

Variáveis	% MS
Composição química	
Matéria seca (%)	32,13
Cinzas (% MS)	2,69
FDN ¹ (% MS)	48,75
PB ² (% MS)	7,43
Amido (% MS)	31,6
Contagem de microrganismos	
Leveduras (log UFC.g ⁻¹)	6,62
Fungos filamentosos (log UFC.g ⁻¹)	3,63
Bactérias ácido lácticas (log UFC.g ⁻¹)	6,87

¹FDN = fibra em detergente neutro; ²PB = proteína bruta.

Houve efeito da interação ($P = 0,0103$) inoculação x tempo de estocagem nos valores de pH das silagens. Observou-se que o pH de todas as silagens reduziu com o consequente aumento do tempo de fermentação. Entre as silagens avaliadas, o pH manteve-se igual até 30 dias de armazenamento. Com o avanço do tempo de estocagem, o pH das silagens CONTROL e C2 se mantiveram iguais a partir de 45 dias de fermentação, mas foram menores em comparação à silagem C1 em ambos períodos.

Os diferentes tempos de estocagem das silagens afetaram a contagem de leveduras no momento que os silos foram abertos ($P = 0,010$), onde maiores tempos de fermentação reduziram a contagem desses microrganismos. A presença de leveduras na silagem foi maior quando estas foram armazenadas por apenas 15 dias. Além disso, tem-se que a contagem de leveduras permaneceu igual entre as silagens quando estocadas por, no mínimo, 30 dias. A inoculação também afetou ($P = 0,010$) a contagem de leveduras, reduzindo a contagem destes microrganismos em comparação à silagem CONTROL. A contagem de fungos filamentosos, por sua vez, foi afetada apenas pela inoculação ($P = 0,0014$), onde a presença destes microrganismos foi maior para as silagens não inoculadas. O uso de inoculantes nas silagens C1 e C2 diminuiu a contagem de fungos filamentosos para menos de 2 log UFC.g⁻¹.

A contagem de bactérias do ácido láctico (BAL) foi influenciada pela interação inoculação x tempo de estocagem ($P < 0,0001$). Um maior tempo de estocagem garantiu um aumento na contagem de bactérias nas silagens C1 e C2. Enquanto que a silagem C1 obteve maior crescimento bacteriano até 90 dias de fermentação, o número de bactérias na silagem C2 se manteve estável já com 45 dias de ensilagem. A silagem CONTROL, por sua vez, reduziu a contagem de BAL à medida que aumentou o tempo de estocagem.

Durante o período de 15 dias de estocagem, a silagem C2 apresentou contagem de BAL superior à da silagem CONTROL. Uma diferença na contagem desses microrganismos nas silagens só pôde ser observada a partir da terceira abertura dos silos, com 45 dias de armazenamento. As silagens C1 e C2 apresentaram mesma contagem de BAL, mas superior comparado à silagem CONTROL. Com 90 dias de estocagem, a contagem de BAL se mostrou maior apenas para a silagem C1, seguida da C2 e menor para a silagem CONTROL.

A concentração de ácido láctico nas silagens foi afetada pelo tempo de armazenamento da forragem nos silos ($P < 0,0001$). Silagens que foram submetidas a um período de estocagem de 45 dias apresentaram um acréscimo de 0,7% na sua concentração em comparação com as silagens armazenadas por 30 dias. O tempo de estocagem também afetou as concentrações de ácido acético nas silagens ($P < 0,0001$). A produção máxima deste ácido foi obtida entre 45 e 90 dias de fermentação. A utilização dos inoculantes também alterou a concentração do ácido acético nas silagens ($P < 0,0001$). Dentre as silagens, a C2 apresentou maior concentração de ácido acético, seguida da silagem C1 e da silagem CONTROL.

Houve efeito da interação ($P = 0,0041$) inoculação x tempo de estocagem na concentração de ácido propiônico das silagens. A concentração deste ácido se manteve igual durante todo o período de estocagem para as silagens que não foram inoculadas. As silagens C1 e C2 aumentaram as concentrações do ácido propiônico com o aumento do tempo de estocagem. Para as silagens C1, a menor concentração do ácido propiônico ocorreu nas silagens com 15 dias de estocagem em comparação com o período de 90 dias. A silagem C2, por sua vez, apresentou maior concentração de ácido propiônico nas silagens com mais de 45 dias de fermentação.

Tabela 2 – Valores de MS, pH, contagem de microrganismos e produtos finais da fermentação de silagens de planta inteira de milho, com ou sem inoculante bacteriano, em diferentes tempos de estocagem (continua).

Tempo de estocagem	Tratamento			Média	EPM ⁴	P-valor		
	CONTROL ¹	C1 ²	C2 ³			I ⁵	T ⁶	I*T ⁷
MS (%)								
15	32,0	32,4	32,1	32,2 B				
30	33,3	33,8	33,6	33,5 A				
45	30,6	30,6	30,1	30,4 C	0,3080	0,9379	<,0001	0,0805
90	30,2	29,0	29,9	29,7 D				
Média	31,5	31,4	31,4					
pH								
15	3,70 aA	3,72 aA	3,73 aA	3,71				
30	3,66 aB	3,65 aB	3,66 aB	3,66				
45	3,65 bBC	3,67 aB	3,65 bB	3,66	0,008529	0,0347	<,0001	0,0103
90	3,63 bC	3,66 aB	3,62 bC	3,64				
Média	3,66	3,67	3,66					
Leveduras (log UFC.g ⁻¹)								
15	4,23	3,98	3,41	3,88 A				
30	3,22	2,44	2,21	2,62 B				
45	3,43	2,49	2,59	2,83 B	0,4240	0,0010	0,0010	0,6437
90	3,65	2,25	1,50	2,46 B				
Média	3,63 a	2,79 b	2,43 b					

¹CONTROL = silagem sem inoculação; ²C1 = silagem inoculada com cepas *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. buchneri*; ³C2 = silagem inoculada com cepas *L. rhamnosus*, *L. buchneri* e *L. diolivorans*; ⁴EPM = erro padrão da média; ⁵inoculação; ⁶tempo de estocagem; ⁷interação inoculação x tempo de estocagem. Letras minúsculas e letras maiúsculas iguais seguidas na mesma linha e na mesma coluna, respectivamente, não diferem entre si ($P > 0,05$).

Tabela 2 – Valores de MS, pH, contagem de microrganismos e produtos finais da fermentação de silagens de planta inteira de milho, com ou sem inoculante bacteriano, em diferentes tempos de estocagem (continua).

Tempo de estocagem	Tratamento			Média	EPM ⁴	P-valor		
	CONTROL ¹	C1 ²	C2 ³			I ⁵	T ⁶	I*T ⁷
Fungos filamentosos (log UFC.g ⁻¹)								
15	2,01	1,75	1,39	1,70				
30	2,40	1,32	1,29	1,67				
45	2,99	1,38	1,40	1,92	0,4716	0,0014	0,6023	0,8571
90	3,09	1,67	1,64	2,13				
Média	2,62 a	1,53 b	1,42 b					
BAL (log UFC.g ⁻¹)								
15	7,26 bA	7,45 abC	7,56 aB	7,42				
30	7,00 aA	7,11 aD	7,17 aC	7,10				
45	6,48 bB	7,85 aB	7,92 aA	7,41	0,09223	<,0001	<,0001	<,0001
90	5,09 cC	8,21 aA	8,00 bA	7,10				
Média	6,46	7,66	7,66					
Ácido lático (% MS)								
15	5,36	5,16	5,42	5,31 B				
30	5,86	5,33	5,80	5,66 B				
45	6,03	6,31	6,74	6,36 A	0,2448	0,1844	<,0001	0,1329
90	5,92	6,73	6,46	6,37 A				
Média	5,79	5,88	6,11					
Ácido acético (% MS)								
15	1,38	1,33	1,45	1,39 B				
30	1,43	1,45	1,87	1,58 B				
45	1,50	1,91	2,30	1,90 A	0,1666	<,0001	<,0001	0,0690
90	1,50	2,04	2,70	2,08 A				
Média	1,45 c	1,68 b	2,08 a					

¹CONTROL = silagem sem inoculação; ²C1 = silagem inoculada com cepas *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. buchneri*; ³C2 = silagem inoculada com cepas *L. rhamnosus*, *L. buchneri* e *L. diolivorans*; ⁴EPM = erro padrão da média; ⁵inoculação; ⁶tempo de estocagem; ⁷interação inoculação x tempo de estocagem. Letras minúsculas e letras maiúsculas iguais seguidas na mesma linha e na mesma coluna, respectivamente, não diferem entre si ($P > 0,05$).

Tabela 2 – Valores de MS, pH, contagem de microrganismos e produtos finais da fermentação de silagens de planta inteira de milho, com ou sem inoculante bacteriano, em diferentes tempos de estocagem (conclusão).

Tempo de estocagem	Tratamento			Média	EPM ⁴	P-valor		
	CONTROL ¹	C1 ²	C2 ³			I ⁵	T ⁶	I*T ⁷
Ácido propiônico (% MS)								
15	0,23 aA	0,22 aB	0,23 aB	0,22				
30	0,22 bA	0,27 aAB	0,30 aB	0,26				
45	0,27 bA	0,28 bAB	0,49 aA	0,34	0,0430	<,0001	0,0004	0,0041
90	0,21 cA	0,35 bA	0,58 aA	0,38				
Média	0,23	0,28	0,40					
Etanol (% MS)								
15	0,12 bB	0,18 aA	0,16 aA	0,19				
30	0,14 aAB	0,12 aB	0,12 aB	0,12				
45	0,16 aA	0,10 bB	0,13 bB	0,13	0,01141	0,0005	<,0001	<,0001
90	0,16 aA	0,11 bB	0,13 bB	0,15				
Média	0,15	0,17	0,13					
1,2-propanodiol (% MS)								
15	0,04 bA	0,41 aD	0,41 aC	0,29				
30	0,03 bA	0,56 aC	0,54 aB	0,37				
45	0,04 bA	0,84 aB	0,83 aA	0,57	0,02806	<,0001	<,0001	<,0001
90	0,04 cA	0,92 aA	0,75 bA	0,57				
Média	0,03	0,68	0,63					

¹CONTROL = silagem sem inoculação; ²C1 = silagem inoculada com cepas *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. buchneri*; ³C2 = silagem inoculada com cepas *L. rhamnosus*, *L. buchneri* e *L. diolivorans*; ⁴EPM = erro padrão da média; ⁵inoculação; ⁶tempo de estocagem; ⁷interação inoculação x tempo de estocagem. Letras minúsculas e letras maiúsculas iguais seguidas na mesma linha e na mesma coluna, respectivamente, não diferem entre si ($P > 0,05$).

As silagens com 15 e 30 dias de fermentação não tiveram diferença nas concentrações de ácido propiônico. A silagem C2 teve maior concentração de ácido propiônico com 45 e 90 dias de fermentação, superior às silagens CONTROL e C1 com o mesmo tempo de estocagem. As silagens CONTROL e C1 não tiveram diferença na concentração de ácido propiônico quando estocadas por um período de 45 dias, contudo, quando armazenadas por 90 dias, a silagem C1 obteve maior concentração deste ácido, com uma diferença de produção de 0,14% do ácido em relação à silagem CONTROL para o mesmo período.

A interação inoculação x tempo de estocagem afetou a produção de etanol nas silagens ($P < 0,0001$). Com exceção da silagem CONTROL, ambas as silagens inoculadas reduziram a concentração de etanol com o aumento do tempo de estocagem. A silagem C1 teve redução de 0,18 para 0,11% para as silagens estocadas por 15 e 90 dias, respectivamente, enquanto que a silagem C2 reduziu de 0,16 para 0,13% a concentração deste álcool, nos mesmos tempos de estocagem. Durante o período de 15 dias de estocagem, a concentração de etanol foi igual para as silagens C1 e C2 e menor concentração na silagem não inoculada. Todas as silagens obtiveram a mesma concentração deste álcool quando estocadas por um período de 30 dias, contudo, as silagens C1 e C2 com 45 e 90 dias de fermentação tiveram concentrações de etanol iguais, porém menores em comparação à silagem CONTROL. Esta, por sua vez, teve maior concentração de etanol com 45 dias de fermentação, mantendo seu teor constante até de 90 dias de estocagem.

A concentração de 1,2-propanodiol também foi influenciada pela interação inoculação x tempo de estocagem ($P < 0,0001$). A silagem CONTROL não demonstrou aumento nas concentrações 1,2-propanodiol com o aumento do tempo de estocagem, mantendo sua concentração baixa e constante em comparação às silagens inoculadas. Com 15 dias de fermentação, as silagens C1 e C2 já apresentaram maior concentração dos teores desse álcool nas silagens. Com 30 dias de fermentação, a silagem C1 obteve concentração de 1,2-propanodiol igual à silagem C2 até 45 dias de estocagem. Na silagem C1, a concentração do álcool continuou a aumentar até as silagens armazenadas por 90 dias, efeito este oposto ao observado na silagem C2 onde teve uma redução dos teores de 1,2-propanodiol quando armazenadas por 90 dias. Os resultados referentes às perdas de matéria seca, deterioração aeróbia e estabilidade aeróbia das silagens estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Perdas na deterioração aeróbia, deterioração aeróbia, e estabilidade aeróbia de silagens de planta inteira de milho, com ou sem inoculante bacteriano, em diferentes tempos de estocagem.

Tempo de estocagem	Tratamentos			Média	EPM ⁴	P-valor			
	CONTROL ¹	C1 ²	C2 ³			I ⁵	T ⁶	I*T ⁷	
Perdas na deterioração aeróbia (% MS)									
15	1.35	0.87	0.65	0.95 B					
30	1.10	0.85	0.75	0.90 B					
45	1.05	0.95	1.02	1.00 B	0.1047	0.0003	0.0102	0.1093	
90	1.32	1.12	1.15	1.19 A					
Média	1.20 a	0.95 b	0.88 b						
Deterioração aeróbia (°C)									
15	12.8 aA	4.5 cA	8.9 bA	8.74					
30	3.6 aB	3.1 aAB	2.9 aB	3.22					
45	4.1 aB	3.2 aAB	3.9 aB	3.76	0.8091	<.0001	<.0001	0.0005	
90	3.8 aB	1.2 bB	2.3 abB	2.46					
Média	6.08	3.02	4.54						
Estabilidade aeróbia (h)									
15	28 aB	27 aD	32 aD	29					
30	40 bB	63 aC	63 aC	55					
45	57 bA	82 aB	94 aB	78	4.8607	<.0001	<.0001	<.0001	
90	60 bA	175 aA	175 aA	137					
Média	46	87	91						

¹CONTROL = silagem sem inoculação; ²C1 = silagem inoculada com cepas *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. buchneri*; ³C2 = silagem inoculada com cepas *L. rhamnosus*, *L. buchneri* e *L. diolivorans*; ⁴EPM = erro padrão da média; ⁵inoculação; ⁶tempo de estocagem; ⁷interação inoculação x tempo de estocagem. Letras minúsculas e letras maiúsculas iguais seguidas na mesma linha e na mesma coluna, respectivamente, não diferem entre si ($P > 0,05$).

As perdas de matéria seca das silagens na deterioração aeróbia teve influência da inoculação ($P = 0,0003$) e do tempo de estocagem ($P = 0,0102$). Observaram-se maiores perdas na deterioração aeróbia nas silagens estocadas por 90 dias. A inoculação, por sua vez, reduziu tais perdas para as silagens C1 e C2. A interação inoculação x tempo de estocagem ($P < 0,0005$) afetou a deterioração aeróbia das silagens. O maior acúmulo de temperatura foi observado com 15 dias de fermentação para as silagens CONTROL, seguida da silagem C2 e por fim da silagem C1. Entre as silagens que foram submetidas à estocagem de 90 dias, a silagem C1 foi a que obteve menor acúmulo de temperatura nas silagens em comparação à CONTROL, mas que não diferenciou da silagem C2.

A interação inoculação x tempo de estocagem das silagens afetou a estabilidade aeróbia das silagens ($P < 0,0001$). Em todas elas, a estabilidade aeróbia aumentou com o tempo de estocagem. Na silagem CONTROL, a estabilidade das silagens estocadas durante 15 e 30 dias permaneceram iguais, assim como para as silagens estocadas durante 45 e 90 dias. Percebe-se que houve um aumento de 32 horas na estabilidade quando as silagens permaneceram estocadas de 30 para 90 dias.

As silagens C1 e C2 obtiveram um tempo de estabilidade similar, onde ambas foram capazes de permanecer estáveis por 63 horas quando armazenadas por 30 dias, apenas 3 horas a mais se compararmos com as silagens não inoculadas com 90 dias de armazenamento. A estabilidade máxima alcançada com o uso dos inoculantes foi de 175 horas para ambas as silagens com 90 dias de fermentação. Durante o período de fermentação de 15 dias, todas as silagens tiveram quebra da estabilidade aeróbia igual, com 28, 27 e 32 horas para as silagens CONTROL, C1 e C2, respectivamente. As silagens inoculadas conseguiram obter um adicional de 23 horas quando estocadas por 30 dias, em relação à silagem CONTROL.

4 DISCUSSÃO

As perdas de MS durante o processo de conservação ocorrem naturalmente, onde a intensidade desta está relacionada, principalmente, com a atividade metabólica de microrganismos. Durante o processo inicial de fermentação, mais precisamente na fase aeróbia do processo fermentativo, pode ocorrer a formação de CO_2 durante a fermentação dos carboidratos solúveis pelos microrganismos (McDONALD et al., 1991). A produção do dióxido de carbono está associada com as perdas de MS na fermentação no silo, onde tais perdas irão depender da espécie microbiana dominante e do tipo de substrato fermentado (BORREANI et al., 2018).

É de amplo conhecimento que a atividade metabólica de leveduras tem como produtos finais da fermentação o etanol e CO₂ quando utilizam a glicose como substrato (WOLFORD, 1984). Contudo, as silagens avaliadas não apresentaram um aumento na contagem desses microrganismos com o aumento do período de estocagem, o que sugere que as perdas de MS podem estar associadas à atividade metabólica de outros microrganismos (Tabela 2).

A inoculação, ainda que não tenha influenciado na quantidade de perdas nas silagens, promoveu o aumento da contagem de BAL na população de microrganismos, o que pode ter acarretado, indiretamente, nas perdas de MS (Tabela 2). A presença de BAL pertencente ao grupo das heterofermentativas na composição dos inoculantes pode ter contribuído com o aumento de tais perdas, uma vez que também produzem o CO₂ como um dos produtos da fermentação (WILKINSON; BOLSEN; LIN, 2003). Em se tratando das bactérias pertencentes à espécie *L. buchneri*, esses microrganismos podem apresentar processos metabólicos que permanecerão ativos durante longos períodos de estocagem, acarretando em maiores quantidades de CO₂ (KLEINSCHMIT; KUNG, 2006). Assim, as maiores perdas de MS nas silagens provavelmente estão associadas à maior contagem de BAL heterofermentativas nas silagens.

Uma das premissas de utilizar inoculantes bacterianos com cepas de BAL é de potencializar a fermentação no silo, o que dependerá fortemente do tipo de cepa que o compõe. A redução dos valores de pH nas silagens está associado com a atividade das bactérias homofermentativas, que tem como principal produto formado o ácido láctico, responsável pela rápida acidificação do meio (McDONALD et al., 1991). Aliado a isso, Pahlow et al. (2003) ressaltam que a atividade metabólica dessas bactérias pode variar de 2 a 6 semanas, para que o perfil fermentativo seja completamente estabilizado no interior do silo. De acordo, nas silagens em estudo, a estabilização do pH das silagens se deu entre 30 e 45 dias de fermentação, mesmo que o pH das silagens C1 tenha sido maior em relação às demais com 45 dias de estocagem (Tabela2).

A presença de bactérias heterofermentativas obrigatórias (*L. buchneri*) na composição dos inoculantes possivelmente contribuiu com maiores valores de pH nessas silagens. A produção de ácido acético por essas bactérias está relacionado com a via de fermentação anaeróbia do ácido láctico como substrato, e não necessariamente com a via da pentoses (OUDE ELFERINK et al., 2001; MUCK et al., 2018). Redução dos teores de ácido láctico na forragem ensilada acarreta em valores de pH mais elevados, como observado nas silagens C1, haja visto que este ácido é responsável pela acidificação da forragem no interior do silo (McDONALD et al., 1991).

O tempo que o silo permanece vedado garante a menor atividade de leveduras, pois impede que ocorra a penetração do oxigênio na massa (BERNARDES et al., 2018). Não obstante a isso, é comum no processo de ensilagem ter uma quantidade de oxigênio residual no interior do silo depois que ocorre a sua vedação. A maior contagem de leveduras nas silagens que tiveram menor tempo de estocagem pode estar relacionada com a presença do oxigênio na massa (PAHLOW et al., 2003). Somado a isso, um curto período de estocagem pode não ser suficiente para garantir uma produção adequada de ácidos orgânicos que, direta ou indiretamente, auxiliam no controle de leveduras (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999). De fato, as silagens estocadas por 15 e 30 dias não apresentaram diferenças nos teores de ácido lático e ácido acético, porém, silagens armazenadas por 30 dias tiveram contagem de leveduras inferior às silagens estocadas por 15 dias. Logo, a maior contagem de leveduras pode estar relacionada ao oxigênio residual e não necessariamente aos teores de ácido lático e ácido acético nas silagens armazenadas por 15 dias. Além disso, ocorre a competição entre as leveduras e as BAL pelos carboidratos presentes na planta no início do processo de fermentação, podendo garantir a maior participação dos microrganismos deterioradores em silagens estocadas por curtos períodos de tempo (McDONALD et al., 1991).

A adição dos inoculantes contendo cepas de BAL homofermentativas e heterofermentativas muito provavelmente contribuiu com a redução da contagem de leveduras nas silagens que receberam esse tipo de tratamento. Além da importância do ácido lático no rápido abaixamento do pH, a adição de BAL heterofermentativas presentes na composição dos inoculantes possivelmente auxiliou no controle do crescimento das leveduras. O fornecimento desse tipo de microrganismos tem o ácido acético como um dos produtos finais da fermentação (McDONALD et al., 1991). O ácido acético apresenta características antimicrobianas que são capazes de controlar o crescimento de microrganismos capazes de deteriorar a silagem, como é o caso das leveduras e dos fungos filamentosos (DAVISON, 1997). Outro efeito do uso de inoculantes na silagem está no aumento da população de BAL que irão complementar aqueles microrganismos já presentes na planta. A adição de BAL na silagem oriundos dos inoculantes contribuiu com o aumento da contagem de BAL nas silagens inoculadas, o que não ocorreu com as silagens sem a adição dos inoculantes (Tabela 2).

A concentração dos produtos finais da fermentação é diretamente dependente da atividade metabólica das BAL que irão formá-los a partir da fermentação dos carboidratos. Assim, maiores concentrações de ácido lático e de ácido acético nas silagens deram-se pelo

maior aporte de BAL advindas da inoculação. O fato da concentração do ácido láctico aumentar com o tempo de estocagem está relacionado com o estabelecimento da população desses microrganismos com maior crescimento populacional das BAL. Arelado a isso, era de se esperar que uma maior concentração do ácido láctico ocorresse em 45 dias de fermentação, uma vez que este período coincide com uma maior contagem de BAL nas silagens inoculadas.

Nas silagens inoculadas, ambos os inoculantes apresentam cepas de *L. buchneri* em sua composição, sendo esta uma das principais bactérias heterofermentativas pertencente ao grupo das BAL (MUCK et al., 2018). Tem-se então a formação do ácido acético e, como dito anteriormente, a atividade metabólica dessas bactérias pode continuar ativa por longos períodos de estocagem (PAHLOW et al., 2003). Além disto, a produção do ácido acético pode ocorrer tanto pela utilização de carboidratos como pela conversão anaeróbia do ácido láctico em ácido acético e 1,2-propanodiol (WOLFORD, 1984; DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999). Diferente dos ácidos fracos, o 1,2-propanodiol não possui efeito sobre a estabilidade aeróbia de silagens (DANNER et al., 2003), mas pode ser observado facilmente nas silagens. O fato do 1,2-propanodiol ter um aumento na sua concentração em longos períodos de estocagem está diretamente ligado à atividade da *L. buchneri*, aumentando a concentração deste álcool nas silagens C1 (PAHLOW et al., 2003).

Entretanto, houve um efeito inverso nas silagens inoculadas com o combo C2. Essas silagens quando submetidas a um período de estocagem por 90 dias, houve redução da concentração do 1,2-propanodiol para estas silagens. A principal razão disto está na presença de cepas de bactérias da espécie *L. diolivorans* na composição do inoculante C2. As bactérias *L. diolivorans* tem como única e exclusiva função a conversão do 1,2-propanodiol em 1-propanol e ácido propiônico, um ácido fraco capaz de auxiliar na estabilidade aeróbia das silagens (KROONEMAN et al., 2002; FILYA, et al. 2004). De fato, no presente estudo foi possível constatar que silagens inoculadas com combo C2 tiveram maior concentração do ácido propiônico, ao mesmo tempo em que houve a diminuição dos teores de 1,2-propanodiol nas silagens estocadas por 45 dias. Outro álcool produzido durante a fermentação da forragem é o etanol, produto final formado pela atividade metabólica de leveduras (McDONALD et al., 1991). O fato de o ácido acético ter propriedades antifúngicas e estar em maior concentração nas silagens inoculadas, exerceu maior controle na atividade desses microrganismos, resultando numa menor produção de etanol nessas silagens.

As perdas de nutrientes e o acúmulo de temperatura no processo de deterioração aeróbia são alguns dos efeitos mais comuns quando a silagem sofre a ação dos microrganismos deterioradores (BORREANI et al., 2018). Tempos de armazenamentos mais

prolongados garantem a produção de uma silagem de melhor valor nutricional, em contra partida, estas se tornam mais susceptíveis à atividade de microrganismos deterioradores (DANIEL et al., 2014). As leveduras são os principais microrganismos responsáveis pela deterioração da massa e, quando se refere à silagem de milho, estas apresentam altas concentrações de ácido lático no momento da abertura do silo, tornando-as mais propensas à deterioração (WEINBERG; MUCK, 1996).

Ainda que o tempo de estocagem diminua a contagem de leveduras na silagem de milho, o mesmo não pode ser afirmado com relação à intensidade do processo de deterioração que a acomete. Silagens com um tempo de estocagem considerado baixo (e.g. 15 dias) tendem a ter uma alta contagem de microrganismos que deterioraram a massa, mesmo quando as silagens são inoculadas (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999). Todavia, a temperatura da silagem, em conjunto com outros parâmetros, pode ser utilizada como um índice de avaliação da qualidade de silagens (BORREANI; TABACCO, 2010) e, o aumento da temperatura pode ser controlado a partir da inibição da ação dos microrganismos deterioradores, especialmente as leveduras. O aumento do tempo de estocagem reduz a carga microbiana da silagem e o fato destas terem sido tratadas com inoculantes bacterianos contendo BAL que visam o controle de leveduras explica o menor acúmulo de temperatura nas silagens C1 e C2 durante a exposição aeróbia.

Garantir a segurança sanitária das silagens durante a exposição ao oxigênio é de suma importância quando ocorre o desabastecimento do silo. A presença de ácidos fracos com características antifúngicas (e.g. ácido acético e ácido propiônico) permitem melhorias na estabilidade aeróbia de silagens. Contudo, as baixas concentrações desses ácidos fracos em silagens estocadas por curtos períodos pode limitar a utilização desse tipo de alimento conservado (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999). O maior tempo de estabilidade aeróbia das silagens inoculadas está atrelado ao maior aporte de ácidos orgânicos fracos (acético e propiônico) advindos da maior atividade de BAL, especialmente das heterofermentativas que, associado com o maior tempo de estocagem, permitiu a maior concentração destes na silagem.

Diversos são os tipos de produtos formados durante o processo fermentativo da forragem e alguns não trazem benefícios durante a preservação do material ensilado, bem como no manejo pós-abertura, a exemplo do 1,2-propanodiol (DANNER et al., 2003). Todavia, a possibilidade de se aproveitar um produto formado naturalmente durante a fermentação da forragem e promover a sua conversão em outro composto com características

benéficas à silagem, é bastante notório. A participação de cepas de bactérias da espécie *L. diolivorans* na inoculação pode permitir tal benefício, como foi observado no presente estudo.

A habilidade da *L. diolivorans* em converter o 1,2-propanodiol em ácido propiônico como observado na silagem C2 em comparação às demais, associado com o tempo de estabilidade, comprova isso. O ácido propiônico é um composto que apresenta características antifúngicas similares, porém mais eficiente, ao ácido acético. Além da redução do pH na interior da célula, sua maior capacidade em controlar os microrganismos deterioradores também está associado à inibição do transporte de aminoácidos através das vesículas das membranas das células, os quais são mais tóxicos que os ácidos (FREESE et al., 1973; MOON, 1983).

É de amplo conhecimento que as bactérias pertencentes ao gênero *Propionibacterium* são as principais produtoras de ácido propiônico em silagens. Contudo, a atividade dessas bactérias é fortemente inibida em silagens de planta inteira de milho, por serem microrganismos muito sensíveis ao ambiente ácido característico dessas silagens, o que impossibilita a produção eficiente do ácido propiônico (PAHLOW; HONIG, 1994). Logo, é relevante a utilização de outros microrganismos capazes de suportar o meio ácido e de possuir o ácido propiônico como um dos produtos finais da fermentação (e.g. *L. diolivorans*), possibilitando maiores concentrações de ácidos fracos (ácido acético e ácido propiônico) na silagem em menores tempos de estocagem (e.g. 45 dias).

5 CONCLUSÃO

A inoculação permitiu um maior aporte de BAL, o que possibilitou maiores concentrações de ácidos orgânicos (lático, acético e propiônico), bem como redução da contagem de microrganismos deterioradores e menores perdas durante a estocagem e exposição aeróbia. A inoculação com o aditivo C2 promoveu silagens com maiores concentrações de ácido propiônico a partir de 45 dias de fermentação. Com isso, a inoculação possibilitou que silos abertos com menor tempo de estocagem (e.g. 45 dias) obtivessem estabilidade aeróbia superior a de silagens mais tardias (90 dias), sem inoculação.

6 IMPLICAÇÕES

A partir do levantamento, foi possível observar que a participação de alimentos conservados na dieta de animais de alto desempenho é bastante notória nos sistemas intensivos de produção leiteira. Silagem de planta inteira de milho foi a principal fonte de forragem adotada pelos produtores. Contudo, a preocupação com o valor nutricional desse alimento é um ponto relevante e ao mesmo tempo crítico dentro das propriedades, visto que é altamente instável na presença do oxigênio, podendo afetar o desempenho dos animais. Com isso, técnicas que visem o controle do processo de deterioração, consequentemente melhorando a estabilidade aeróbia, são cruciais na produção desse alimento na propriedade.

Silagens de planta inteira de milho são alimentos que apresentam baixa estabilidade aeróbia, requerendo maiores tempos de estocagem (e.g. 90 dias). No entanto, nesse estudo foi possível observar que a inoculação entre a associação de diferentes cepas de BAL com a concomitante produção de diferentes ácidos orgânicos com características antifúngicas (ácido acético e ácido propiônico), melhorou a estabilidade aeróbia de silagens de planta inteira de milho em menor (e.g. 45 dias) e maior tempo de estocagem. Logo, em condições práticas, é possível garantir maior estabilidade aeróbia de silagens de planta inteira de milho, especialmente em situações adversas na propriedade em que ocorra a necessidade de abrir um silo com menor tempo de estocagem.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**, 15th ed. Arlington, VA, USA: AOAC International, 1990.
- BERNARDES, T. F. et al. Top spoilage losses in maize silage sealed with plastic films with different permeabilities to oxygen. **Grass and Forage Science**, v. 67, n. 1, p. 34-42, 2012.
- BERNARDES, T. F. et al. Silage review: unique challenges of silages made in hot and cold regions. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 4001-4019, 2018.
- BORREANI, G. et al. Silage review: factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 3952-3979, 2018.
- BORREANI, G.; TABACCO, E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 93, n. 6, p. 2620-2629, 2010.
- CONAGHAN, P.; O'KIELY., P; O'MARA, F. P. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. **Journal of Dairy Science**. 93, 628–643, 2010.
- DANIEL, J. L. P. et al. Alterações na qualidade de silagens de milho durante o armazenamento. In: JOBIM, C. C.; CECATO, U.; CANTO, M. W.; BANKUTI, F. I. (eds.). SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 5.,, 2014. Maringá, **Anais...** Maringá, 2014. p. 23-36.
- DANNER, H. et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n.1, p. 562-567, 2003.
- DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTIVELLE, T. J. (Ed). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 520-556.
- 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 yeasts growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 4, p. 583-594, 1999.
- FILYA, I. The effect of *Propionibacterium acidipropionic*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied and Microbiology**. v. 97, n. 4, p. 818-826, 2004.
- HALL, M. B.; MERTENS, D. R. Technical note: effect of sample Processing procedures on measurement of starch in corn silage and corn grain. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 91, n.12, p. 4830-4833, 2008.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG JR, L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage during various stages of ensiling. **Journal of Dairy Science**. v. 89, n. 10, p. 3999-4004, 2006.

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

McDONALD, P. et al. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK. 1991.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**. 85, 1217–1240, 2002.

MUCK, R. E. et al. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 3980-4000, 2018.

MORAN J. P. et al. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: JONES, D. I. H.; JONES, R.; DEWHURST, R; MERRY, R. J. (Eds) **Proceedings...** Aberystwyth: UK, 1996, pp. 162–163. Aberystwyth, UK: University of Wales.

MUCK, R. E. et al. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.

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

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

Statistical Analysis System – SAS. **System for Microsoft Windows**: release 8.2. Cary: 2001. 1 CD-ROM.

TABACCO, E. et al. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. **Journal of Applied Microbiology**. v. 107, n. 5, p. 1632–41, 2009.

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

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

WOOLFORD, M. K. The chemistry of silage. In: WOOLFORD, M. K. (Ed.) **The Silage Fermentation**. 1st ed. Madison, 1984. 350p.