

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE PLANTA E DE  
GRÃOS ÚMIDOS DE MILHO.**

**Fernanda Carvalho Basso**  
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Fevereiro de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE PLANTA E DE  
GRÃOS ÚMIDOS DE MILHO.**

**Fernanda Carvalho Basso**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis  
Co-orientadores: Prof<sup>o</sup> Dr. Thiago Fernandes Bernardes  
Prof<sup>o</sup> Dr. Ana Claudia Ruggieri**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Dezembro de 2009**

B322e Basso, Fernanda Carvalho Basso  
Estabilidade aeróbia de silagens de planta e de grãos úmidos de milho/ Fernanda Carvalho Basso. – Jaboticabal, 2010  
ii, 80 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010  
Orientador: Ricardo Andrade Reis  
Banca examinadora: Clóves Cabreira Jobim, Antonio Fernando  
Bergamaschine  
Bibliografia

1. Deterioração aeróbia. 2. Filme plástico. 3. Inoculante microbiano. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.085.52:633.15

**FERNANDA CARVALHO BASSO** – filha de Verginia Teresa Carvalho Basso e Carlos Alberto Araújo Basso, nasceu em São Paulo – SP, em 8 de outubro de 1984. Ingressou na primeira turma do curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira em agosto de 2003, onde foi vice-presidente do Centro Acadêmico de Zootecnia (2003-2004), discente membro titular do conselho de departamento de Biologia e Zootecnia (2004 a 2006) e bolsista da FAPESP no período de outubro de 2005 a setembro de 2007, obtendo o título de Zootecnista em janeiro de 2008. Em março de 2008 ingressou no curso de pós-graduação, Mestrado em Zootecnia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal – SP.

*“Se você pensa que é um derrotado,  
Você será derrotado.  
Se não pensar ‘quero a qualquer custo’,  
Não conseguirá nada.  
Mesmo que você queira vencer, mas se pensa que não vai conseguir,  
A vitória não sorrirá para você.*

*Se você fizer as coisas pela metade,  
Você será um fracassado.  
Nós descobrimos neste mundo  
Que o sucesso começa pela nossa intenção  
E tudo se determina pelo nosso espírito.*

*Se você pensa que é um malogrado,  
Você o será.  
Se você almeja atingir uma posição mais elevada  
Deve, antes de obter a vitória,  
Dotar-se da convicção de que conseguirá  
Infalivelmente.*

*A luta pela vida, nem sempre é vantajosa;  
Nem aos fortes, nem aos espertos.  
Mais cedo ou mais tarde,  
Quem cativa à vitória é aquele que crê plenamente:  
Eu conseguirei.”*

*Napoleon Hill*

## **DEDICO**

A Deus por me guiar e proteger.

Aos meus queridos pais, Verginia Teresa Carvalho Basso e Carlos Alberto Araújo Basso, por todo apoio e carinho.

Sem vocês não chegaria aonde cheguei. Muito Obrigada!

## **OFEREÇO**

Ao meu namorado Bruno Nascimento Lodo por sempre estar ao meu lado, me apoiando, ajudando e aconselhando.

Muito obrigada, por tudo o que fez por mim!

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Campus de Jaboticabal – SP pela grande oportunidade de realização desta pesquisa e do curso de Mestrado.

Ao Cnpq pela concessão da bolsa.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Ricardo Andrade Reis pela oportunidade, orientação e confiança.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Thiago Fernandes Bernardes, pela co-orientação e colaboração nesse trabalho.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Claudia Ruggieri por toda colaboração e apoio.

À Empresa Lallemand pela doação do inoculante microbiano.

Aos professores Ruben Pablo Schoken Iturrino e Rita de Cássia Panizzi pela colaboração científica.

A técnica do Laboratório de nutrição animal, Ana Paula; a secretária do Departamento de Zootecnia, Adriana; aos funcionários da FEPP, Fernandinho, Ferrari, Pontieri, Fernando, Perninha, Businaro, Odair e Nascimento; a técnica do laboratório de fitopatologia, Lúcia Ramos; a técnica do laboratório de microbiologia Silvina que de alguma forma colaboraram para realização desta pesquisa.

Aos membros da banca, Prof<sup>o</sup> Dr. Antônio Fernando Bergamaschine e Prof<sup>o</sup> Dr. Clóves Cabreira Jobim, pelas sugestões e conhecimentos transmitidos.

À minha família por todo carinho, apoio e sempre acreditarem em mim.

Ao Sr. Gilberto, Dna Adilha e Tia Miriam pelo apoio e carinho.

Ao meu querido namorado Bruno por sempre estar do meu lado me ajudando, mesmo quando tinha suas coisas para fazer.

Às minhas amigas de graduação Fabiana, Bruna e Gabriela pela contínua e verdadeira amizade.

À minha querida amiga colombiana Verônica Cadavid pelas conversas e risadas, espero que nossa amizade continue mesmo a longa distância.



As amigas e amigos da pós-graduação Juliana Huback, Marcelinha, Darcilene, Karla, Hellen e Mingau por todo apoio e carinho.

Ao amigo Max pela paciência e colaboração como estagiário.

A todos os colegas do setor de forragicultura pelo apoio e paciência.

À Anna Paula (Nanica) por toda colaboração na pesquisa e auxílio nas dúvidas.

Aos estagiários e amigos Marina, Flávia, Erika, Tamyres, Álvaro e Luana pela ajuda na execução desta pesquisa. A presença de vocês é indispensável!

Ao pesquisador Gustavo Rezende Siqueira pela colaboração científica.

A todos que de alguma forma colaboraram com a condução desta pesquisa.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
SUMMARY.....	ii
<b>CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>1</b>
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Qualidade da silagem.....	2
2.2. Estabilidade aeróbia.....	3
2.3. Deterioração aeróbia.....	3
2.4. Inoculantes bacterianos.....	4
2.4.1. Inoculante bacteriano heterofermentativo: <i>Lactobacillus buchneri</i> .....	5
2.5. Filme de baixa permeabilidade ao oxigênio.....	6
3. REFERÊNCIAS.....	8
<b>CAPÍTULO 2 - ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE PLANTA INTEIRA DE MILHO INOCULADA COM <i>Lactobacillus buchneri</i>.....</b>	<b>13</b>
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. Ensilagem.....	16
2.2. Abertura.....	16
2.3. Perdas por gases.....	17
2.4. Recuperação de matéria seca.....	17
2.5. Análises químico-bromatológicas.....	17
2.6. Análises microbiológicas.....	19

2.7. Estabilidade aeróbia.....	20
2.8. Análise estatística.....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
3.1. Características iniciais da planta de milho.....	21
3.2. Perdas por gases e recuperação de matéria seca.....	22
3.3. Características fermentativas e valor nutricional das silagens.....	23
3.4. Estabilidade aeróbia.....	29
4. CONCLUSÕES.....	34
5. REFERÊNCIAS.....	35
<b>CAPÍTULO 3 - ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE GRÃOS ÚMIDOS DE MILHO INOCULADA COM <i>Lactobacillus buchneri</i>.....</b>	<b>40</b>
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1. Ensilagem.....	43
2.2. Abertura.....	43
2.3. Perdas por gases.....	44
2.4. Recuperação de matéria seca.....	44
2.5. Análises químico-bromatológicas.....	44
2.6. Análises microbiológicas.....	46
2.7. Estabilidade aeróbia.....	47
2.8. Análise estatística.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1. Características iniciais da planta de milho.....	47
3.2. Perdas por gases e recuperação de matéria seca.....	48
3.3. Características fermentativas e valor nutritivo das silagens.....	50

3.4. Estabilidade aeróbia.....	53
4. CONCLUSÕES.....	59
5. REFERÊNCIAS.....	59
<b>CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DO FILME DE BAIXA PERMEABILIDADE AO OXIGÊNIO NO CONTROLE DA ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGEM DE MILHO.....</b>	<b>63</b>
1. INTRODUÇÃO.....	64
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4. CONCLUSÕES.....	77
5. REFERÊNCIAS.....	77

## ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE PLANTA E DE GRÃOS ÚMIDOS DE MILHO.

**RESUMO** – objetivou-se avaliar a estabilidade aeróbia de silagens de planta e de grãos úmidos de milho com a utilização de inoculante microbiano, bem como o uso de filme plástico de baixa permeabilidade ao oxigênio associado ao filme convencional. Para tanto foram conduzidos três experimentos. No primeiro e segundo experimentos os objetivos foram avaliar os efeitos de doses de *Lactobacillus buchneri* ( $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC/ g) sobre as características fermentativas, a dinâmica microbiológica, a estabilidade aeróbia e o valor nutricional de silagens de planta e de grãos úmidos de milho. No terceiro experimento, objetivou-se avaliar o efeito do filme plástico de baixa permeabilidade ao oxigênio associado ao filme convencional sobre a perdas na armazenagem e a estabilidade aeróbia de silagem de planta de milho, em silo tipo superfície. O *L. buchneri* é eficiente no controle de leveduras e fungos filamentosos, assim como melhora a estabilidade aeróbia da silagem de planta e de grãos úmidos de milho e não afeta o valor nutricional. O filme de baixa permeabilidade ao oxigênio associado ao filme convencional é eficiente na manutenção das características fermentativas, no controle da população de leveduras e na redução de perdas, principalmente quando a fatia de retirada é menor.

**Palavras-chave:** características fermentativas, deterioração aeróbia, filme plástico, inoculante microbiano, perdas

## **AEROBIC STABILITY OF PLANT AND OF HIGH MOISTURE CORN SILAGE.**

**SUMMARY** - aimed to evaluate the aerobic stability of plant and of high moisture corn silage with the use of microbial inoculant and oxygen barrier film associated with conventional film. Therefore, three experiments were conducted. In the first and second experiments the objectives were to evaluate the effects of *Lactobacillus buchneri* doses ( $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6$  CFU/g) on the fermentation characteristics, microbial dynamics, aerobic stability and nutritional value of plant and of grain moisture corn silage. The third experiment aimed to evaluate the effect of oxygen barrier film associated with conventional film under the storage losses and aerobic stability of plant corn silage in a horizontal silo. The *L. buchneri* is effective in control of yeasts and molds, and improve the aerobic stability of plant and of high moisture corn silage and do not affect nutritional value. The oxygen barrier film is effective in maintaining the fermentation characteristics, in yeasts population control and loss reduction, mainly when the feedout rate is lower.

**Keywords:** aerobic deterioration, fermentation characteristics, microbial inoculant, losses, plastic film

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO

O processo de ensilagem é muito importante para preservar a qualidade da forragem com vistas à utilização durante o período de baixa oferta de pasto. Apesar da fermentação da silagem ocorrer naturalmente sob condições de anaerobiose, devido aos microrganismos epífitas, a fermentação rápida e eficiente é variável e depende do número e tipos de bactérias ácido lácticas da cultura. Além disto, outros fatores como o teor de matéria seca, a capacidade tamponante da cultura a ser ensilada e o conteúdo de açúcares fermentáveis disponíveis afetam intensamente o processo fermentativo (KUNG JR., 2008).

A silagem de milho é o volumoso conservado mais utilizado em todo o mundo e a silagem de grãos úmidos de milho está sendo cada vez mais utilizada no Brasil. Entretanto, essas silagens são ricas em carboidratos solúveis e ácido láctico, o que as tornam susceptíveis a deterioração aeróbia no pós-abertura dos silos. Contudo, silagens de grãos úmidos de milho, em geral, fermentam menos extensivamente que silagem de planta de milho (HOFFMAN & MUCK, 1999). No entanto, especialmente nos meses de clima quente, esses dois tipos de silagens são comumente deteriorados durante a retirada da silagem para fornecimento aos animais.

Com a entrada de oxigênio no silo, ocorre a deterioração da massa devido à presença de ácido láctico e a alta concentração de nutrientes, que servem como substrato para leveduras. Por sua vez as leveduras fazem o meio propício ao crescimento de fungos filamentosos (*Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*) e de bactérias indesejáveis (*Acetobacter* e *Bacillus*), acarretando perdas no valor nutritivo e deteriorando a silagem, conseqüentemente diminuindo o consumo e afetando o desempenho animal.

Visando sanar este problema, pesquisadores buscaram formas de mitigar essas perdas, por meio do uso de inoculantes microbianos heteroláticos (MUCK, 1996), que são de fácil utilização, não são corrosivos ao maquinário e não poluem o ambiente

(CONTRERAS-GOUVEIA & MUCK, 2006) e da utilização do filme plástico de baixa permeabilidade ao oxigênio (DEGANO, 1999) na vedação de silos horizontais.

Contudo, poucos estudos tem sido realizados com inoculantes heteroláticos em silagens de planta e de grãos úmidos de milho no Brasil (ZOPOLLATTO et al., 2009) e com o filme de baixa permeabilidade ao oxigênio na vedação de silos horizontais.

Neste contexto, objetivaram-se avaliar os efeitos das doses de *Lactobacillus buchneri* e o do filme de baixa permeabilidade ao oxigênio associado ao filme convencional sobre a estabilidade aeróbia de silagens de planta e de grãos úmidos de milho.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Qualidade da Silagem**

De acordo com JOBIM & BRANCO (2002), o termo qualidade da silagem deve ser medida pela resposta do animal que está consumindo este volumoso, sendo invariavelmente empregado para definir o padrão de fermentação e a qualidade nutricional do material.

Segundo COSTA et al. (2001), os fatores que determinam o padrão de fermentação durante a ensilagem, intrínsecos à planta forrageira, são representados pelo teor de umidade, teor de carboidratos solúveis e poder tampão. Com relação aos fatores do meio, uma fermentação adequada só é garantida em ambiente de anaerobiose, pela adoção correta das técnicas da ensilagem, tais como o ponto de colheita, tamanho da partícula, rápido carregamento do silo, compactação adequada para expulsão de oxigênio, uso de aditivos, tipo de silo e eficiência de drenagem de efluentes.

No entanto, para SIQUEIRA et al. (2005) um dos pontos que normalmente não são observados é a fase de exposição aeróbia. Segundo esses autores, quando as silagens são expostas ao ar, microrganismos oportunistas iniciam atividade metabólica produzindo calor e consumindo nutrientes, alguns produtos da fermentação passam a ser substrato, assim microrganismos outrora latentes podem começar a se desenvolver.



Nesse sentido, o desabastecimento do silo e o fornecimento da silagem aos animais se revelam como um importante dreno de massa seca e energia.

## **2.2. Estabilidade aeróbia**

O termo estabilidade aeróbia é definido como o tempo necessário para se verificar mudanças mensuráveis da temperatura, sendo altamente variável de poucas horas a semanas (SIQUEIRA et al., 2005). Normalmente, a quebra da estabilidade aeróbia é definida como o tempo necessário para que a silagem ultrapasse a temperatura ambiente de 1°C (DRIHEUIS et al., 2001) a 2°C (KUNG JR. et al., 2003). Além da temperatura, de acordo com PITT et al. (1991) e PHILLIP & FELLNER (1992), a concentração de carboidratos solúveis, a população de fungos e a concentração de ácidos orgânicos em interação com o pH são os parâmetros que mais afetam a estabilidade das silagens.

PHILLIP & FELLNER (1992) afirmaram que o aumento do pH após a exposição da silagem ao ar, a queda no teor de carboidratos solúveis e a baixa concentração de ácido láctico são importantes indicadores da deterioração da massa ensilada.

Neste contexto, as silagens de milho, tanto as de planta como as de grãos úmidos, representam um substrato de alto valor nutricional para o desenvolvimento dos microrganismos oportunistas, responsáveis pela deterioração aeróbia, sendo caracterizadas como silagens de alta degradação aeróbia (JOBIM & BRANCO, 2002).

## **2.3. Deterioração aeróbia**

O processo de deterioração aeróbia é essencialmente microbiano e o crescimento dos microrganismos é condicionado por condições físicas e químicas das silagens (PAHLOW et al., 2003), ou seja, presença de oxigênio e substrato são fundamentais para que esse processo se inicie.

A deterioração aeróbia da silagem está associada, principalmente ao desenvolvimento de leveduras e fungos (MUCK et al., 1991). As leveduras (*Cândida* e *Hansenula*) provocam grande liberação de dióxido de carbono pelo metabolismo dos açúcares, resultando em perdas de massa seca, ainda podem consumir ácido láctico,

sendo a causa da elevação do pH criando condições para o crescimento de fungos e bactérias indesejáveis durante a fase de utilização da silagem.

Principalmente, espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, crescem em silagens onde há penetração de oxigênio, sendo indesejáveis pela formação de toxinas, as quais podem acarretar prejuízos aos animais quando ingeridas (MUCK, 1988; MAHANNA, 1994).

O assunto deterioração aeróbia não se limita às questões relacionadas com as perdas, pois, além das leveduras e fungos filamentosos, algumas espécies de bactérias como clostrídeos, bacilos e listeria podem influenciar nos aspectos ligados à sanidade da silagem (LINDGREN et al., 2002).

Portanto, estratégias como utilização de inoculantes bacterianos heteroláticos e de filmes plásticos de baixa permeabilidade ao oxigênio associado ao filme convencional têm sido estudadas como alternativas para controlar a estabilidade aeróbia das silagens.

#### **2.4. Inoculantes bacterianos**

A maioria dos inoculantes bacterianos aplicados em silagens, tem como principal função, estimular a produção de ácido láctico durante o processo de fermentação. As bactérias homofermentativas, mais comuns, usadas em inoculantes para silagens são: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus cerevisiae*, entre outras. Estes organismos fazem com que o pH durante a fermentação diminua rapidamente, bem como as perdas da matéria seca, e em alguns casos melhoram o desempenho animal. Entretanto, os produtos da fermentação das silagens produzidos por inoculantes bacterianos homofermentativos, às vezes podem resultar em silagens menos estáveis quando expostas ao ar, comparadas às não inoculadas. Isto ocorre porque o ácido láctico produzido por estas bactérias pode prontamente ser metabolizado por microrganismos indesejáveis que atuam nas silagens quando expostas ao ar (PAHLOW et al., 2003).

Até a metade da década de 90 o principal enfoque das indústrias era desenvolver tecnologias a base de bactérias homofermentativas, entretanto, o meio científico iniciou pesquisas com uma cepa heterofermentativa (*Lactobacillus buchneri*),

como alternativa para controlar a deterioração aeróbia durante a exposição da silagem ao ar (DRIEHUIS et al., 1996; WEINBERG & MUCK, 1996).

#### **2.4.1. Inoculante bacteriano heterofermentativo: *Lactobacillus buchneri***

Na literatura são mencionadas duas vias de degradação pelas bactérias ácidos lácticas heterofermentativas, mais especificamente pela *Lactobacillus buchneri*, a qual não contém a enzima *acetaldéido desidrogenase* que converte o acetaldéido em etanol, sendo a primeira via proposta por McDONALD et al. (1991) onde estas bactérias degradam carboidratos solúveis (glicose e frutose) em lactato, acetato, manitol, dióxido de carbono e água; e a segunda via proposta mais recentemente por OUDE ELFERINK et al. (2001), onde estes microrganismos degradam ácido láctico em ácido acético, 1,2-propanodiol, dióxido de carbono e traços de etanol.

Apesar do acetato ser considerado um ácido pouco eficiente, quanto a função de reduzir o pH da silagem, observa-se ação eficiente sobre o metabolismo de leveduras e fungos filamentosos (MOON, 1983). Segundo DAVIDSON (1997) este ácido em pH inferior ao seu pKa (4,73) permanece na forma não dissociada, onde a membrana dos microrganismos se torna permeável a ele, ocorrendo a entrada do ácido na célula via transporte passivo. Dentro da célula, o ácido é dissociado ( $\text{RCOO}^- + \text{H}^+$ ) devido ao pH ser próximo de 7,0, liberando íons  $\text{H}^+$ , o que reduz o pH intracelular. Para manter o pH intracelular constante o microrganismo deve eliminar os íons  $\text{H}^+$ , perdendo energia neste processo e retardando o seu crescimento e podendo chegar a morte da célula (Figura 1).

O *Lactobacillus buchneri* é usado em silagens de capins, milho, leguminosas e grãos úmidos. Este inoculante foi testado com o intuito de melhorar a estabilidade aeróbia das silagens reduzindo o crescimento de microrganismos indesejáveis como mofo e leveduras (COMBS & HOFFMAN, 2001). Usando a estirpe *L. buchneri* como inoculante atuante na estabilidade aeróbia das silagens, DRIEHUIS et al. (1999) observaram o acúmulo de ácido acético com consumo de ácido láctico em silagens de milho e conseqüentemente inibição do desenvolvimento de leveduras durante a fase de anaerobiose.

A melhora na estabilidade aeróbia de silagem de milho tem sido relatada em estudos como o de RANJIT & KUNG JR. (2000) que avaliaram concentrações de *L. buchneri* e observaram que durante a exposição aeróbia, as silagens inoculadas apresentaram menores elevações de pH, reduzidas perdas de carboidratos solúveis e de ácido lático. FILYA et al. (2006) também estudaram concentrações de *L. buchneri* em silagem de milho e observaram que doses acima de  $5 \times 10^5$  UFC/g de silagem resultaram em diminuição das leveduras e melhorou a estabilidade aeróbia.

TAYLOR & KUNG JR (2002) verificaram que o *L. buchneri* 40788 pode aumentar a estabilidade aeróbia de silagem de grãos úmidos de milho quando aplicado a uma concentração  $\geq 5 \times 10^5$  UFC/g, em silos de laboratório. REIS et al. (2008) verificaram o efeito de doses de *L. buchneri* em silagens de grãos úmidos de milho e observaram que doses maiores que  $1 \times 10^5$  UFC/g de silagem foram eficazes no controle de fungos filamentosos e leveduras fazendo com que a estabilidade da silagem aumentasse.

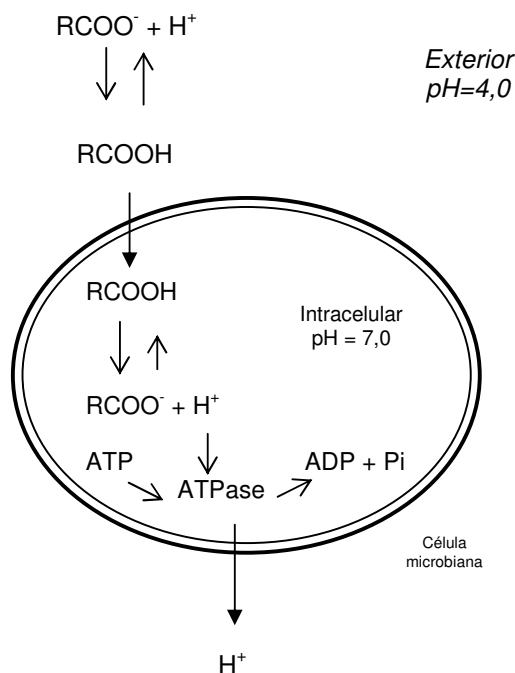


Figura 1 – Destino do ácido orgânico em ambiente de baixo pH e na presença da célula microbiana  
Fonte: Modificado de DAVIDSON (1997)

## **2.5. Filme de baixa permeabilidade ao oxigênio.**

De maneira geral, nas condições brasileiras, as silagens são armazenadas, principalmente em silos horizontais. Nestes silos, há alta propensão à deterioração aeróbia na fase de utilização, devido a grande área de superfície exposta ao ar.

Os efeitos danosos do ar na qualidade da silagem são manifestados por dois caminhos. O primeiro ocorre na camada superficial durante o armazenamento pela penetração de oxigênio através do filme plástico de cobertura (SAVOIE & JOFRIET, 2003). O segundo efeito danoso do ar está relacionado à estabilidade aeróbia no painel do silo durante o período de remoção da silagem, usualmente manifestado pelo aparecimento de fungos, alterações no valor nutritivo e aquecimento da massa (PAHLOW et al., 2003).

No silo, as zonas mais porosas estão localizadas nas camadas superficiais e laterais, devido principalmente a dificuldade de compactação durante o enchimento. Quanto mais a massa é porosa, mais facilmente o ar poderá penetrar no seu interior, portanto, a redução da porosidade é a prerrogativa principal para conter a deterioração aeróbia (BERNARDES et al., 2009).

O material mais comum utilizado na vedação dos silos horizontais é o filme de polietileno (BORREANI et al., 2007), pelas suas características de mecânicas e de baixo custo (BORREANI & TABACCO, 2008), contudo, o polietileno apresenta elevada permeabilidade ao oxigênio (SNELL et al., 2002).

Segundo KUZIN & SAVOIE (2001) as perdas nas áreas periféricas do silo são influenciadas pela espessura do filme plástico que deve ser proporcional ao tempo de estocagem da silagem. De acordo com SAVOIE (1988), as espessuras do filme de polietileno indicadas para confecção de silos de superfície são de 100, 150 e 200  $\mu\text{m}$  e devem ser usadas por 3, 7 e 12 meses, respectivamente.

Além da espessura do filme plástico, a permeabilidade ao oxigênio pode ser alterada pela sua coloração e pela temperatura ambiental. As flutuações da temperatura durante os dias determinam diferenças de pressão entre o gás no interior do silo e aquele da atmosfera circundante (TABACCO & BORREANI, 2002), e tais diferenças causam fluxo de gás, do exterior para o interior e vice-versa. Assim, quanto

maior for a permeabilidade do filme plástico, maior será o fluxo de gás (SAVOIE, 1988; TABACCO & BORREANI, 2002).

Entre as moléculas plásticas utilizáveis, a poliamida é um polímero que tem menor permeabilidade ao oxigênio, cerca de 90 vezes inferior à do polietileno. Segundo a American Society for Testing and Materials Standards (ASTM D3985-81) a permeabilidade do polietileno ao O<sub>2</sub> à temperatura de 23 °C e umidade relativa de 85% é de 178.000 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/24h/bar/μm de espessura, enquanto a poliamida apresenta 2000 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/24h/bar/μm de espessura. Estes valores aumentam notavelmente quando a temperatura é elevada a 50°C (534.000 e 10.000, respectivamente). Isto significa que durante o verão os riscos de deterioração aeróbia de silagens se elevam, principalmente nos países de clima tropical, pelo aumento da permeabilidade dos filmes plásticos (BERNARDES et.al, 2009).

DEGANO (1999) na 12<sup>a</sup> Conferencia Internacional sobre Silagem sugeriu uma nova estratégia de vedação, envolvendo a utilização de um filme de baixa permeabilidade ao oxigênio como alternativa ao filme padrão de polietileno. Este filme de baixa permeabilidade possui uma camada de poliamida entre duas camadas de polietileno (WILKINSON & RIMINI, 2002).

Existem dois tipos de filme de baixa permeabilidade, um preto e branco com 125μm de espessura e outro translúcido com 45μm de espessura que é utilizado na Europa e Estados Unidos em combinação com um sombrite. Entretanto, no Brasil têm sido conduzidos estudos com este filme de 45μm de espessura associado com o filme convencional de polietileno (BERNARDES et al., 2009).

### 3. REFERÊNCIAS

BERNARDES, T.F.; AMARAL, R.C.; NUSSIO, L.G. Sealing strategies to control the top losses in horizontal silos. In: The International Symposium on Forage Quality and Conservation, 2009, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro, 2009, p. 190-209.

BORREANI, G.; TABACCO, E.; CAVALLARIN, L. A new oxygen barrier film reduces aerobic deterioration in farm-scale corn silage. **Agronomy Journal**, v.100, n.4, p.942-948, 2008.

BORREANI, G.; TABACCO, E. A new oxygen barrier stretch enhances quality alfalfa wrapped silage. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.10, p.4701-4706, 2008.

COMBS, D.K; HOFFMAN, P.C. *Lactobacillus buchneri* of the aerobic stability in the silage. Focus on Forage. **University of Wisconsin Board of Regents**, v.3, n.14, 2001.

CONTRERAS-GOUVEIA, F.; MUCK, R. Microbial inoculants for silage. **University of Wisconsin Board of Regents**, v.8, n.4, 2006.

COSTA, C.; MONTEIRO, A.L.G.; BERTO, D.A.; ALMEIDA JR, G.A.; LOPES, A.B.R.C. Impacto do uso de aditivos e/ou inoculantes comerciais na qualidade de conservação e no valor alimentício de silagens. *In: Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas*. 1, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2001, p. 87-126.

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

DEGANO, L. Improvement of silage quality by innovative covering system. *In: The International Silage Conference, 12th, 1999, Uppsala. Proceedings...* Uppsala, 1999, p. 296-297.

DRIEHUIS, F.; SPOLESTRA, S.F.; COLE, S.C.J.; MORGAN, R. Improving aerobic stability by inoculation with *Lactobacillus buchneri*. *In: The International Silage Conference, 11th, 1996, Aberystwyth. Proceedings...* Aberystwyth, 1996, p.106-107.

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

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

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

HOFFMAN, P.; MUCK, R. Inoculating high moisture corn. **University of Wisconsin Board of Regents**, v.8, n.4, 1999.

JOBIM, C.C.; BRANCO, A.F. Qualidade de forragens conservada *versus* produção e qualidade do leite de vacas. *In: II Sul-Leite - Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil*. 1, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2002, p. 98-122.

LINDGREN, S.; OLDENBURG, E.; PAHLOW, G. Influence of microbes and their metabolites on feed and food quality. *In: General meeting of the European Grassland Federation*. 19th, 2002, La Rochelle. **Proceedings...** La Rochelle, 2002, p.503-511.

KUNG JR., L.; TAYLOR, C.C.; LYNCH, M.P.; NEYLON, J.M. The effects of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, n. 1, p.336–343, 2003.

KUNG JR., L. The aerobic stability of silages. *In: 2nd International Symposium on Animal Production under Grazing*, 2008, Viçosa, Brazil. **Proceedings ...** Viçosa, 2008. p. 233-248.

KUZIN, V.; SAVOIE, P. Modeling air infiltration in bunker silos to optimize the cover. *In: Annual International Meeting Sponsored*. Sacramento: ASAE. 2001, 10p.

MAHANNA, B. Proper management assures high-quality silage, rains. **Feedstuffs**, v.10, p.12-59, 1994.

McDONALD, P.; HENDERSON, A .R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340 p.

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



MUCK, R.E. Factors influencing silage quality and they implications for management. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 11, p. 2992-3002, 1988.

MUCK, R.E.; PITT, R.E.; LEIBENSPERGER, R.Y. A model of aerobic fungal growth in silage. Microbial characteristics. **Grass Forage Science**, v. 46, n. 3, p. 283-290, 1991.

MUCK, R. E. **A lactic acid bacteria strain to improve aerobic stability of silages**. In U.S. Dairy Forage Research Center. Madison, WI. p. 46-47, 1996.

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

PAHLOW, G; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-94.

PHILLIP, L.E.; FELLNER, V. Effects of bacterial inoculation of high-moisture ear corn on its aerobic stability, digestion, and utilization for growth by beef steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, n.10, p.3178-3187, 1992.

PITT, R.E.; MUCK, R.E.; PICKERING, N.B. A model of aerobic fungal growth in silage.2.Aerobic stability. **Grass and Forage Science**, Oxford, v.46, n.3, p.301-312, 1991.

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

REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ALMEIDA, E.O.; JANUSCKIEWICZ, E.R.; BERNARDES, T.F.; ROTH, A.P.T.P. Efeito de doses de *Lactobacillus buchneri* “cepa ncimb 40788” sobre as perdas nos períodos de fermentação e pós-abertura da silagem de grãos úmidos de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 923-934, 2008.

SAVOIE, P. Optimization of plastic covers for stack silos. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 41, p. 65-73, 1988.

SAVOIE, P.; JOFRIET, J.C. Silage Storage. *In*: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 405-468.

SIQUEIRA, G.R.; BERNARDES, T.F.; REIS, R.A. Instabilidade aeróbia de silagens: efeitos e possibilidades de prevenção. *In*: Simpósio sobre volumosos na produção de ruminantes, 10, 2005, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 2005, p.25-60.

SNELL, H.G.J; OBERNDORFER, C; LUCKE, W; VAN DEN WEGHE, H.F.A. Effects of the colour and thickness of polyethylene film on ensiling conditions and silage quality of chopped maize, as investigated under ambient conditions and mini-silos. **Grass and Forage Science**, v. 57, p. 342-350, 2002.

TABACCO, E.; BORREANI, G. Extent of aerobic deterioration in farm maize silage as affected by silo management. *In*: The International Silage Conference, 13<sup>th</sup>, 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive, 2002, p.178-179.

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

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L.G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, suplemento, p. 170-189, 1999.

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

WILKINSON, J.M.; RIMINI, R. Effect of triple co-extruded film (TCF) on losses during the ensilage of ryegrass. p. 168–169. *In*: The International Silage Conference, 13<sup>th</sup>, 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive, 2002, p.178-179.

## **CAPÍTULO 2 –ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE PLANTA DE MILHO INOCULADA COM *Lactobacillus buchneri*.**

**RESUMO** – O *Lactobacillus buchneri* tem sido testado com o intuito de melhorar a estabilidade aeróbia das silagens reduzindo o crescimento de fungos. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos das doses de *L. buchneri* sobre as características fermentativas, a dinâmica microbiológica, a estabilidade aeróbia e o valor nutricional de silagens de planta de milho. Os tratamentos foram controle (sem *L. buchneri* - SLB),  $5 \times 10^4$  (LB1),  $1 \times 10^5$  (LB2),  $5 \times 10^5$  (LB3) e  $1 \times 10^6$  (LB4) UFC/g de forragem, avaliados nos 0, 4, 8 e 12 dias de exposição aeróbia. Após 130 dias de ensilagem, os silos foram abertos, retiradas amostras da silagem para avaliação dos valores de pH; os teores de MS, ácidos orgânicos, nitrogênio amoniacal; desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos e valor nutricional, além da avaliação da temperatura para caracterizar a estabilidade aeróbia. Foram observadas diferenças entre os teores de MS. Os valores de pH não diferiram significativamente entre as silagens na fase de fermentação, todavia durante a exposição aeróbia, os valores de pH aumentaram. As silagens inoculadas apresentaram-se estáveis até o quarto dia de exposição aeróbia, exceto as doses a partir de  $5 \times 10^5$  UFC /g apresentaram menores valores de pH até o oitavo dia. As concentrações de ácido acético foram maiores nas silagens inoculadas. Os teores de ácido láctico não diferiram entre as silagens. As contagens dos fungos foram menores nas silagens inoculadas. A estabilidade aeróbia foi melhorada com a adição do inoculante. O *L. buchneri* é eficiente na proteção contra leveduras e fungos filamentosos em silagem de milho, melhorando a estabilidade aeróbia da silagem, em condições de laboratório. O valor nutricional da silagem de milho não é afetado pela adição do inoculante.

## 1. INTRODUÇÃO

O processo de ensilagem é muito importante para preservar a qualidade da forragem com vistas à utilização durante o período de baixa oferta de pasto. Apesar da fermentação da silagem ocorrer naturalmente sob condições de anaerobiose, devido aos microrganismos epífitas, a fermentação rápida e eficiente é variável e depende do número e dos tipos de bactérias ácido lácticas da cultura. Além disto, outros fatores como teor de matéria seca, capacidade tamponante da cultura e conteúdo de açúcares fermentáveis disponíveis afetam intensamente o processo fermentativo (KUNG JR., 2008).

A cultura do milho atende os requisitos para uma ensilabilidade adequada, contudo no pós-abertura dos silos, a silagem de milho torna-se susceptível a deterioração, devido à presença de ácido láctico e a alta concentração de nutrientes. Estes servem como substrato para leveduras, que por sua vez tornam o meio propício ao crescimento de fungos filamentosos (*Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicilium*) e bactérias indesejáveis (*Acetobacter* e *Bacillus*), deteriorando a forragem, conseqüentemente diminuindo o consumo e afetando o desempenho animal.

A maior parte dos substratos oxidados são açúcares e ácido láctico, sugerindo que silagens ricas em açúcares residuais e/ou inoculadas com bactérias homofermentativas são susceptíveis a deterioração aeróbia (McDONALD et al. 1991).

Com o objetivo de sanar este problema, pesquisadores buscaram formas de se mitigar essas perdas, pelo do uso de inoculantes microbianos heteroláticos, que são de fácil utilização, não são corrosivos ao maquinário, bem como não poluem o ambiente. Esses inoculantes, pela fermentação dos carboidratos solúveis, produzem ácidos orgânicos voláteis, que tem efeito antifúngico.

Até a metade da década de 90, o principal enfoque das indústrias era desenvolver tecnologias a base de bactérias homofermentativas, entretanto, o meio científico iniciou pesquisas com uma cepa heterofermentativa, o *Lactobacillus buchneri*, como alternativa para controlar a deterioração aeróbia durante a exposição da silagem ao ar (DRIEHUIS et al., 1996; WEINBERG & MUCK, 1996).

O *Lactobacillus buchneri* é usado em silagens de capins, leguminosas, milho, sorgo e grãos úmidos. Entretanto, silagens de planta e de grãos úmidos de milho são

mais susceptíveis a deterioração aeróbia do que as de leguminosas e capim, portanto a inoculação com *L. buchneri* pode propiciar um benefício (COMBS & HOFFMAN, 2001). Assim, este inoculante tem sido testado com o intuito de melhorar a estabilidade aeróbia das silagens reduzindo o crescimento de fungos.

A melhora na estabilidade aeróbia de silagem de milho foi relatada em estudos como o de RANJIT & KUNG JR. (2000) que avaliaram concentrações de *L. buchneri* e observaram que durante a exposição aeróbia, as silagens inoculadas apresentaram menores elevações de pH, reduzidas perdas de carboidratos solúveis e de ácido láctico. FILYA et al. (2006) também estudaram concentrações de *L. buchneri* em silagem de milho e observaram que doses acima de 500.000 UFC/g de silagem resultaram em diminuição das leveduras e melhorou a estabilidade aeróbia.

Neste contexto, objetivou-se avaliar os efeitos das doses de *Lactobacillus buchneri* sobre as características fermentativas, a dinâmica microbiológica, a estabilidade aeróbia e o valor nutricional de silagens de planta de milho.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no setor de Forragicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal - SP, localizada a 21°15'22" de latitude sul, 48°18'58" de longitude oeste e 595 metros de altitude, onde o clima na região é subtropical do tipo AWA de acordo com a classificação de Köppen.

O híbrido de milho utilizado foi o Maximus (Syngenta), de ciclo precoce, grão semi duro, semeado em 13 de novembro de 2007 em Latossolo Vermelho eutroférico. Para adubação de semeadura foi utilizado 300 kg ha<sup>-1</sup> da fórmula 8-20-20 e para a adubação de cobertura utilizou-se 400 kg ha<sup>-1</sup> da fórmula 20-0-20. A forragem foi colhida em 26 de fevereiro de 2008, quando os grãos apresentaram de um a dois terços da linha do leite (aproximadamente 32% de MS). Utilizou-se máquina colhedora forrageira Menta regulada para altura de corte de 20 cm e tamanho de partícula de 5 mm.

A forragem foi ensilada após a aplicação das doses do inoculante, sendo este diluído em água destilada, pulverizado com auxílio de borrifador manual sobre a massa

e posteriormente homogeneizados. Na silagem controle (sem inoculante) foi pulverizado apenas o mesmo volume de água destilada.

Os tratamentos foram diferentes concentrações do inoculante bacteriano *Lactobacillus buchneri* (Cepa NCIMB 40788), encontrado comercialmente como LalsilCana®, apresentado na forma de pó e embalado em sachê (100 gramas de produto, contendo  $2,5 \times 10^5$  UFC/ g de produto) recomendado para inocular 50 toneladas de forragem.

Os tratamentos utilizados foram os seguintes:

**SLB** - planta de milho sem *L. buchneri* (controle);

**LB1** - planta de milho inoculada com  $5 \times 10^4$  UFC de *L. buchneri*/ g de forragem;

**LB2**- planta de milho inoculada com  $1 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/ g de forragem;

**LB3** - planta de milho inoculada com  $5 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/ g de forragem;

**LB4** - planta de milho inoculada com  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/ g de forragem.

## 2.1. ENSILAGEM

Como silos experimentais foram utilizados baldes plásticos, com capacidade de 7L. A ensilagem foi realizada com auxílio de bastões de ferro, visando a atingir uma massa específica de  $500 \text{ kg/m}^3$ . Após a compactação, os silos foram fechados com tampa plástica, lacrados com fita adesiva, pesados e armazenados em temperatura ambiente durante 130 dias.

Na ensilagem após a aplicação do inoculante foram retiradas três amostras de cada repetição para determinação química (pH), microbiológica (leveduras e fungos filamentosos) e valor nutricional.

## 2.2. ABERTURA

Após 130 dias de fermentação, anteriormente à abertura, os silos experimentais foram pesados para determinação das perdas por gases, bem como a recuperação de matéria seca. Após a abertura, descartou-se o material deteriorado, o restante (aproximadamente 2 kg de silagem) foi homogeneizado, amostrado e colocado em

balde plásticos (7 L) acondicionados em uma sala fechada em temperatura ambiente (média de 24°C) para avaliação da estabilidade aeróbia por 12 dias (288 horas).

Nos dias 0 (momento da abertura), 4, 8 e 12 após a abertura foram retiradas três amostras de cada repetição para determinação química (pH, ácidos graxos voláteis e ácido láctico) e microbiológica (leveduras e fungos filamentosos), sendo a determinação do nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (NH<sub>3</sub>/NT) e do valor nutricional realizado somente com as amostras do dia 0.

### 2.3. PERDAS POR GASES

A quantificação de perda por gases foi calculada pela equação descrita por MARI (2003):

$$PG (\%) = [(PSI - PSF) / MSI] \times 100, \text{ sendo,}$$

PG: perdas por gases;

PSI: peso do silo no momento da ensilagem (kg);

PSF: peso do silo no momento da abertura (kg);

MSI: matéria seca ensilada (quantidade de forragem (kg) x % matéria seca).

### 2.4. RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA SECA

Para a determinação da recuperação da matéria seca foi utilizado a equação descrita por JOBIM et al. (2007):

$$RMS (\%) = \frac{MSF}{MSI} \times 100$$

RMS: recuperação da matéria seca;

MSF: matéria seca no momento da abertura (quantidade de forragem (kg) x % matéria seca);

MSI: matéria seca ensilada (quantidade de forragem (kg) x % matéria seca).

### 2.5. ANÁLISES QUÍMICO-BROMATOLÓGICAS

Das amostras frescas de silagem foi elaborado extrato aquoso segundo KUNG JR. et al. (1984) para determinar os valores de pH com uso de um peagâmetro digital, a concentração de N amoniacal em relação ao nitrogênio total (NH<sub>3</sub>/NT) mediante a destilação com hidróxido de potássio 2N conforme técnica descrita por FENNER (1965)

adaptada por VIEIRA (1980), os teores dos ácidos orgânicos voláteis por meio de cromatografia gasosa (WILSON, 1971) e os teores de ácido láctico por meio de espectrofotometria colorimétrica (SILVA & QUEIROZ, 2002).

Outra amostra foi utilizada para determinação do valor nutricional da silagem. Para tanto, esta amostra foi colocada em saco de papel, pesada e levada para estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 horas. Após esse período foi pesada novamente, moída em moinho de faca até o tamanho das partículas atingirem menos de 1 mm e armazenadas em potes de plástico.

Os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), nitrogênio total (NT) e extrato etéreo (EE) foram determinados conforme método descrito por SILVA & QUEIROZ (2002), sendo a proteína bruta (PB) obtida pelo produto entre o nitrogênio total e o fator 6,25.

Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidos de acordo com MERTENS (2002), sem o uso de sulfito de sódio e utilizando-se amilase termoestável. Do resíduo da FDN foi obtido o nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) determinado pelo método Kjeldahl. A fibra em detergente ácido (FDA) e a lignina (solubilização da celulose (CEL) em ácido sulfúrico 72%) foram obtidos pelo método sequencial de VAN SOEST & ROBERTSON (1985). A hemicelulose (HEM) foi calculada pela diferença entre FDN e FDA. Nas análises de FDN as amostras foram corrigidas para cinzas e proteína (FDNcp) para quantificação dos carboidratos não fibrosos (CNF) de acordo com WEISS (1993):  $CNF = CHOT - FDNcp$ .

Os carboidratos totais (CHOT) foram obtidos por intermédio da equação descrita por SNIFFEN et al. (1992):  $CHOT = 100 - (\%PB + \%EE + \%CZ)$ .

A digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) e os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram determinados pela técnica da produção de gases, de acordo com a metodologia descrita por MENKE & STEINGASS (1988) modificada por MAURICIO et al. (1999), em que o valor energético é predito através do gás produzido durante a incubação *in vitro* de amostras de alimentos juntamente com fluido ruminal. Cerca de 200 mg de amostra de silagem foram incubadas em frascos de vidro (115 mL). Frascos contendo somente líquido ruminal e meio de cultura (tampão) foram usados como branco. Em cada frasco, foram adicionados 30 mL de meio de incubação.



O líquido ruminal foi obtido de um novilho mestiço fistulado, recebendo dieta à base de capim braquiária e concentrado. Os frascos foram vedados com tampas de borracha e selados com lacres de alumínio e colocados em banho-maria 39°C. A pressão originada pelos gases acumulados na parte superior dos frascos foi medida por um transdutor de pressão conectado a um leitor digital. As leituras foram efetuadas com maior frequência durante o período inicial de fermentação e reduzidas posteriormente (2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 48, 52, 56, 60 e 72 horas). A pressão formada no interior dos frascos foi medida através da inserção de uma agulha acoplada ao transdutor à tampa de borracha e posteriormente transformada em volume, segundo a seguinte equação obtida em ensaio laboratorial  $y = 5,5452x - 0,1569$  ( $r^2 = 0,9997$ ), em que Y é o volume de gás (mL) e X é a pressão (psi).

Foram utilizadas as seguintes equações para estimativa da DIVMO e NDT:

$$\text{DIVMO (\%)} = 14,88 + ((0,889 \cdot \text{gas24}) + (0,045 \cdot \text{PB}) + (0,065 \cdot \text{MM}))$$

$$\text{EM (MJ/kg MS)} = 2,20 + (0,136 \cdot \text{gás24}) + (0,0057 \cdot \text{PB}) + (0,00029 \cdot \text{EE})$$

Onde, EM é a energia metabolizável; gás24 é a produção de gás *in vitro* em 24h (ml/0,2 g de MS) e os valores de PB, MM e EE são expressos em g/kg de MS. Posteriormente, esses valores foram convertidos em NDT por meio dos seguintes fatores:

$$\text{ED (Mcal/kg MS)} = \text{EM}/0,82$$

$$\text{NDT (\%)} = \text{ED}/4,409 * 100 \text{ (NRC, 2001)}.$$

## 2.6. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Foram pesados 25 g de forragem fresca, adicionado 225 mL de solução peptonada 0,1% (0,1 g de peptona por litro de água destilada). Após agitação manual foi retirado 1 mL do extrato para as diluições ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ) em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril (8,5 g de NaCl/litro de água destilada). Foi semeado 0,1 mL das diluições em placas de Petri descartáveis contendo o meio ágar batata acidificado (Difco) em duplicata (PARKER, 1979). As placas foram incubadas em aerobiose a 28°C por 48 e 96 horas, conforme HIGGINBOTHAM et al (1998), quando então foi procedida a contagem das colônias de leveduras e fungos, respectivamente.

Os números de microrganismos foram contados como unidade formadora de colônias (UFC) e transformados em logaritmo na base 10.

## 2.7. ESTABILIDADE AERÓBIA

Nos baldes destinados à avaliação da estabilidade aeróbia foi realizada a leitura da temperatura, registrada a cada meia hora por meio de um *data logger* inserido no centro da massa. A temperatura ambiente foi medida por meio de *data logger* distribuídos próximo aos baldes. A quebra da estabilidade aeróbia foi calculada como o tempo gasto em horas, para que a temperatura da silagem se eleve em 2°C acima da temperatura do ambiente (KUNG JR. et al., 2003).

## 2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Para o estudo da estabilidade aeróbia utilizou-se o modelo de medidas repetidas no tempo com três repetições por tratamento.

$$\text{Modelo: } Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + T_i \times H_j + R_k(T_i) + E_{ijk}$$

Onde:

- $\mu$  = média geral;
- $T_i$  = efeito fixo do tratamento;
- $H_j$  = efeito fixo do tempo de exposição aeróbia;
- $T_i \times H_j$  = efeito da interação tratamento x tempo de exposição aeróbia;
- $R_k(T_i)$  = Repetição aninhada com tratamento e;
- $E_{ijk}$  = efeito residual.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. CARACTERIZAÇÃO INICIAL DA PLANTA DE MILHO

A caracterização inicial das plantas de milho na pré-ensilagem em função dos tratamentos está apresentada na Tabela 1. Os teores de MS, MM e EE, expressos em porcentagem, da planta de milho estão dentro do limite encontrado por VALADARES FILHO et al. (2006). Por outro lado, os componentes da fração fibrosa e o teor de PB apresentaram valores inferiores e superiores, respectivamente, aos encontrados pelos referidos autores. Tal fato pode estar relacionado à alta quantidade de grãos produzidos pelo híbrido Maximus.

Os valores de pH foram inferiores aos encontrados por FILYA et al. (2006) de 5,94, por FILYA (2003) de 5,86 e por DRIEHUIS et al. (1999) de 5,87 em planta inteira de milho.

As contagens de leveduras e fungos filamentosos foram maiores às encontradas por FILYA et al. (2006) e por FILYA (2003).

Tabela 1. Caracterização inicial das plantas de milho na pré-ensilagem em função dos tratamentos.

Variáveis <sup>1</sup>	Tratamentos <sup>2</sup>				
	SLB	LB1	LB2	LB3	LB4
MS (%)	29,73±0,88	32,21±0,49	28,73±0,20	29,08±0,69	29,73±0,52
MM (%)	4,19±0,12	3,79±0,41	3,74±0,22	3,54±0,49	3,48±0,30
PB (%)	12,27±0,24	11,75±0,47	11,79±0,81	10,63±1,11	10,11±0,40
EE (%)	3,21±0,15	3,29±0,21	2,92±0,30	2,81±0,85	2,33±0,14
FDN (%) <sup>3</sup>	50,61±2,56	50,93±2,33	50,52±1,00	55,09±6,21	61,98±0,08
FDA (%)	21,18±1,03	20,01±0,80	20,76±1,72	24,61±1,19	24,01±1,07
HEM (%)	30,42±3,43	30,91±3,04	29,75±1,14	30,74±4,99	37,81±1,71
CEL (%)	17,88±0,77	17,05±0,95	18,20±1,75	20,23±1,27	19,63±0,74
LIG (%)	2,78±0,29	2,34±0,41	2,14±0,30	3,48±0,75	3,62±0,78
pH	4,86±0,25	4,86±0,11	4,56±0,31	4,78±0,07	4,81±0,08
Leveduras (Log UFC/g)	7,05±0,04	7,09±0,07	6,96±0,18	6,88±0,90	6,85±0,11
Fungos Filamentosos (Log UFC/g)	5,21±0,25	5,29±0,43	5,43±0,28	5,39±0,27	5,07±0,42

<sup>1</sup>MS: matéria seca total; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; HEM: hemicelulose; CEL: celulose; LIG.: lignina; pH: potencial hidrogeniônico.

<sup>2</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem.

<sup>3</sup>Os teores de FDN não foram corrigidos para cinzas e proteína.

### 3.2. PERDAS POR GASES E RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA SECA

Os resultados referentes às perdas por gases na fermentação são apresentados na Figura 1. Segundo McDONALD et al. (1991), a fermentação heterolática promove maiores perdas de MS pela produção de gases. Entretanto, na presente pesquisa, não se verificou diferença significativa nas perdas por gases entre silagens ( $P > 0,05$ ; CV= 47,89%). Resultado relevante a ser considerado, uma vez que maiores perdas por gases em silagens inoculadas com *L. buchneri* é um aspecto negativo. Contudo, outros autores como MIYAZAKI (2008) e FILYA et al. (2006) encontraram maiores ( $P < 0,05$ ) perdas por gases nas silagens de milho inoculadas com *L. buchneri*.

MIYAZAKI (2008) em estudo das concentrações:  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de silagem de milho encontrou 8,06; 9,01; 9,69; 12,69 e 12,96% de perdas por gases, respectivamente, contra 8,70% da silagem controle ( $P < 0,05$ ). FILYA et al. (2006) encontraram baixas perdas por gases ( $P < 0,05$ ) de 0,72; 0,92; 1,21 e 1,53% quando estudaram doses crescentes de *L. buchneri* (0,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC/g, respectivamente) em silagem de milho.

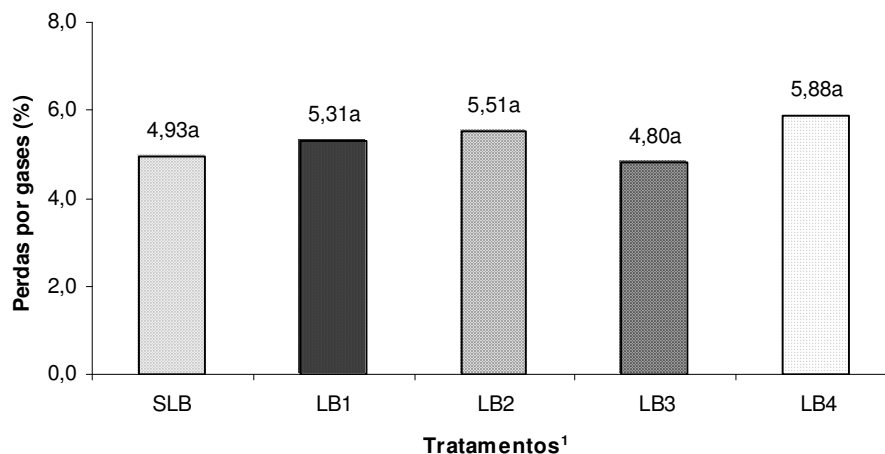


Figura 1. Efeito de doses de *L. buchneri* nas perdas por gases das silagens de milho, expressas em percentagem. Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

<sup>1</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem.

O efeito das doses de *L. buchneri* sobre a recuperação de MS (RMS) das silagens de milho após a fermentação está apresentado na Figura 2. Segundo Woolford (1975), a fermentação homolática, teoricamente, proporciona maior recuperação de MS

comparado com a fermentação heterolática. Entretanto, não se verificou diferença significativa ( $P>0,05$ ) na RMS entre as silagens inoculadas. Apesar da silagem controle ter apresentado maior porcentagem numérica de RMS. Contudo, os percentuais de RMS das silagens inoculadas apresentados na presente pesquisa estão dentro do limite encontrado por KLEINSCHMIT & KUNG JR (2006) em estudo de meta-análise sobre a utilização de *L. buchneri* em silagens de milho.

Semelhante aos resultados obtidos nesta pesquisa, RANJIT et al. (2002) não verificaram diferenças significativas na RMS com o aumento de doses de *L. buchneri* ( $0$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$ ;  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC/g) em silagem de milho, sendo as recuperações de MS das silagens inoculadas numericamente inferiores à silagem controle (99,9; 97,9; 98,5; 97,9 e 99,8%, respectivamente).

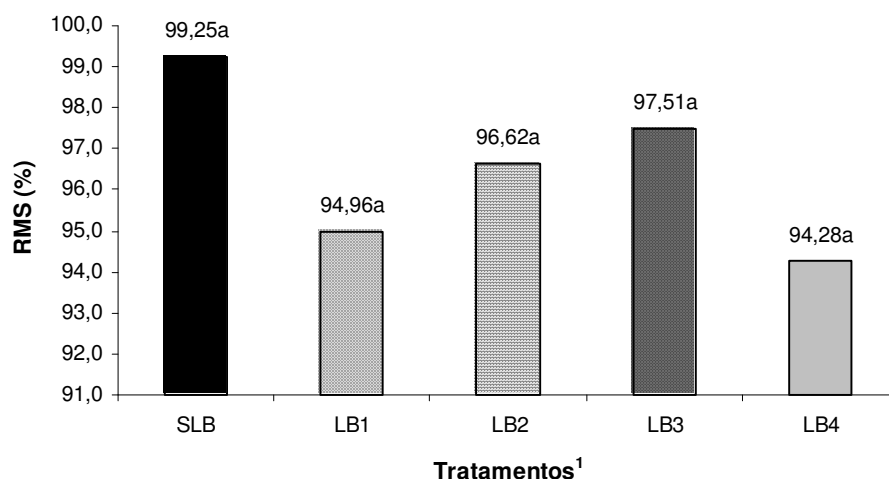


Figura 2. Efeito de doses de *L. buchneri* sobre recuperação da matéria seca (RMS) das silagens de milho expressa em porcentagem da matéria seca ensilada. Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste Tukey ( $P>0,05$ ).

<sup>1</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem.

### 3.3. CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS E VALOR NUTRICIONAL DA SILAGEM

As características fermentativas da silagem de milho após 130 dias de ensilagem, em função dos tratamentos, estão apresentadas na Tabela 2.

Verificou-se que após 130 dias de ensilagem os teores de MS foram inferiores ( $P<0,05$ ) nas silagens inoculadas com doses a partir de 100.000 UFC de *L. buchneri* /g de forragem (tratamentos LB2, LB3 e LB4), quando comparadas com o tratamento

controle (SLB) e o LB1 (Tabela 2). Esta inferioridade nos teores de MS nas silagens inoculadas com doses mais elevadas foi observada possivelmente por causa da conversão heterofermentativa dos carboidratos solúveis, onde ocorre formação de dióxido de carbono e água diminuindo o teor de MS da silagem. Tais resultados diferem dos encontrados por FILYA et al. (2006) e RANJIT et al. (2002) que não verificaram diferenças significativas entre os teores de MS com o aumento das doses de *L. buchneri* em silagem de milho.

Tabela 2. Características fermentativas da silagem de milho após 130 dias de ensilagem.

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>					Média	CV (%) <sup>3</sup>
	SLB	LB1	LB2	LB3	LB4		
MS (%)	32,04 <sup>a</sup>	32,03 <sup>a</sup>	29,08 <sup>b</sup>	29,50 <sup>b</sup>	29,62 <sup>b</sup>	30,45	2,67
pH	3,90 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>	3,95 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>	3,97	1,45
NH <sub>3</sub> /NT <sup>2</sup>	3,31 <sup>b</sup>	5,15 <sup>a</sup>	5,21 <sup>a</sup>	5,75 <sup>a</sup>	5,98 <sup>a</sup>	5,13	14,44
Ácido láctico (%MS)	6,62 <sup>a</sup>	6,70 <sup>a</sup>	6,50 <sup>a</sup>	6,88 <sup>a</sup>	6,47 <sup>a</sup>	6,63	20,33
Ácido acético (%MS)	0,80 <sup>b</sup>	1,06 <sup>ab</sup>	1,24 <sup>a</sup>	1,18 <sup>a</sup>	1,34 <sup>a</sup>	1,12	16,73
Ácido propiônico (%MS)	0,02 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,03	2,20
Ácido butírico (%MS)	0,07 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,17 <sup>a</sup>	0,14	41,15

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste Tukey (P>0,05).

<sup>2</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 - 5x10<sup>4</sup>, LB2 - 1x10<sup>5</sup>, LB3 - 5x10<sup>5</sup>, LB4 - 1x10<sup>6</sup> UFC de *L. buchneri* /g de forragem.

<sup>3</sup>Concentração de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (NH<sub>3</sub>/NT).

<sup>3</sup>CV: coeficiente de variação.

Os valores de pH não diferiram entre as silagens (média 3,97) permanecendo dentro do limite de 3,7 a 4,2 estabelecido por KUNG & SHAVER (2001) para silagem de milho, sendo considerado valor de pH adequado (Tabela 2). Os resultados encontrados corroboram com os de RANJIT & KUNG JR (2000) que verificaram valores de pH de 3,66; 3,67 e 3,72, quando utilizaram silagem de milho: sem inoculante, com 1x10<sup>5</sup> e com 1x10<sup>6</sup> UFC de *L. buchneri* /g, respectivamente. Entretanto, FILYA et al. (2006), RANJIT et al. (2002) e DRIEHUIS et al. (1999) observaram valores mais altos de pH em silagem de milho com o aumento das doses de *L. buchneri* (P<0,05).

A concentração de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (NH<sub>3</sub>/NT) foi maior (P<0,05) nas silagens tratadas em comparação com a silagem sem a aplicação de *L. buchneri* (Tabela 2). FILYA (2003) observou maior concentração de NH<sub>3</sub>/NT em silagem de milho quando aplicou 1x10<sup>6</sup> UFC de *L. buchneri* /g. DRIEHUIS et

al. (1999) verificaram aumento nas concentrações de  $\text{NH}_3/\text{NT}$  em silagem de milho (9,0; 9,2; 9,2; 9,9 e 11,2%MS) com o incremento das doses de *L. buchneri* (0,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g, respectivamente), porém, os autores observaram diferença significativa apenas na maior dose. Por outro lado, FILYA et al. (2006) não encontraram diferença significativa nas concentrações de  $\text{NH}_3/\text{NT}$  em silagem de milho (0,276; 0,268; 0,270 e 0,273%MS) com o aumento das doses de *L. buchneri* (0,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g, respectivamente).

Com relação aos ácidos orgânicos, verificou-se aumento nos teores de ácido acético nas silagens tratadas, porém este incremento foi significativo ( $P < 0,05$ ) quando se inoculou dose a partir de 100.000 UFC de *L. buchneri*/g de silagem de milho (LB2), não diferindo entre os tratamentos LB3 e LB4 (Tabela 2). FILYA et al. (2006), RANJIT et al. (2002) e DRIEHUIS et al. (1999) também observaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nos teores de ácido acético com o incremento das doses de *L. buchneri* em silagem de milho. FILYA (2003) verificou aumento de 1,27 para 3,89%MS e RANJIT & KUNG JR (2000) encontraram aumento de 1,82 para 3,60%MS nos teores de ácido acético em silagem de milho quando utilizaram  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem.

Não foi observada diferença significativa nos teores de ácido láctico entre as silagens (Tabela 2). NISHINO et al. (2003) quando inocularam  $4,4 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem verificaram redução do teor de ácido láctico da silagem de milho inoculada comparada com a silagem controle (3,47 vs 6,41). FILYA (2003) encontrou declínio de 4,04 para 2,76%MS e RANJIT & KUNG (2000) observaram redução de 7,72 para 6,35%MS no teor de ácido láctico na silagem de milho, quando utilizaram  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem. DRIEHUIS et al. (1999) verificaram decréscimo significativo ( $P < 0,05$ ) no teor de ácido láctico em silagem de milho (880, 831, 716, 358 e 126  $\text{mmol kg}^{-1}$ ) para cada dose de *L. buchneri* utilizada ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem, respectivamente).

KLEINSCHMIT et al. (2005) estudaram durante dois anos o efeito da inoculação de duas diferentes cepas de *L. buchneri* (40788 da Lallemand Animal Nutrition e 11A44 da Pionner) em silagem de milho e observaram que no primeiro ano não houve diferença significativa entre teores de ácido láctico nas silagens inoculadas com as diferentes cepas (40778 – 7,73%MS e 11A44 – 7,0%MS) e a silagem controle (8,21

%MS). Todavia no segundo ano experimental um decréscimo significativo ( $P < 0,05$ ) foi observado da silagem controle (7,90%MS) para as tratadas (40778 – 6,75 e 11A44 – 5,57%MS), não diferindo entre as cepas. De acordo os mesmos autores, muitos fatores como maturidade e estação de crescimento podem interferir no resultado das silagens influenciando no efeito dos inoculantes de um ano para o outro.

Na literatura são mencionadas duas vias de degradação pelas bactérias ácidos lácticas heterofermentativas, mais especificamente pela *Lactobacillus buchneri* que não contém a enzima acetaldéido desidrogenase que converte o acetaldéido em etanol, sendo a primeira proposta por McDONALD et al. (1991) onde estas bactérias degradam carboidratos solúveis (glicose e frutose) em lactato, acetato, manitol, dióxido de carbono e água; e a segunda proposta mais recentemente por OUDE ELFERINK et al. (2001), onde estes microrganismos degradam ácido láctico em ácido acético, 1,2-propanodiol, traços de etanol e dióxido de carbono.

Dos resultados obtidos, na presente pesquisa, a respeito das características fermentativas pode-se inferir que, possivelmente, a via de degradação predominante pela bactéria *L. buchneri* foi à proposta por McDONALD et al. (1991), uma vez que o teor de ácido láctico não foi alterado pela adição do inoculante. Sendo o ácido láctico um ácido forte, com o seu pKa inferior ao do ácido acético (3,86 vs 4,75), não houve influencia sobre o pH mesmo ocorrendo incremento do ácido acético com o aumento das doses utilizadas, tal fato explica o baixo valor de pH nas silagens tratadas,

Os teores de ácido propiônico não diferiram significativamente ( $P > 0,05$ ) entre as silagens (Tabela 2). Tais resultados foram semelhantes aos obtidos por KLEINSCHMIT & KUNG JR (2006) os quais não observaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nos teores de ácido propiônico (0,08; 0,06 e 0,11%MS) em silagem de milho inoculada com *L. buchneri* (controle, doses menores de 100.000 e doses maiores que 100.000, respectivamente). RANJIT & KUNG (2000) também não verificaram incremento no teor de ácido propiônico em silagem de milho quando utilizaram  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* g de forragem. Por outro lado, DRIEHUIS et al. (1999) encontraram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) no teor de ácido propiônico da silagem de milho controle de 9 mmol kg<sup>-1</sup> para 43 e 106 mmol kg<sup>-1</sup> quando utilizaram doses de  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* g de forragem, respectivamente.



Não se verificou diferença significativa ( $P>0,05$ ) nos teores de ácido butírico as silagens (Tabela 2). Tais resultados corroboram com os obtidos por RANJIT & KUNG JR (2000), os quais não observaram diferença significativa ( $P>0,05$ ) nos teores de ácido butírico em silagem de milho inoculada com *L. buchneri*.

As características fermentativas das silagens inoculadas e controle (Tabela 2) permaneceram dentro dos limites proposto por KUNG JR & SHAVER (2001), sendo considerado que uma fermentação adequada foi obtida, exceto quanto ao teor de ácido butírico que se apresentou levemente acima do desejado. Mesmo a concentração de nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_3/\text{NT}$ ) apresentando-se superior nas silagens tratadas, esses valores são considerados baixos. Segundo DRIEHUIS et al. (2001), o incremento nas concentrações de nitrogênio amoniacal nas silagens tratadas com *L. buchneri* seria associado ao maior pH durante a fase de armazenamento como resultado da atividade metabólica deste microrganismo. Contudo, na presente pesquisa, os valores de pH não foram influenciados durante a fermentação, sendo assim a resposta para as maiores concentrações de  $\text{NH}_3/\text{NT}$  na silagem de milho inoculada, neste caso, ainda são inconsistentes.

Na Tabela 3 estão apresentados os dados do valor nutritivo das silagens de milho em função dos tratamentos.

Nos teores de PB, houve efeito significativo ( $P<0,05$ ) apenas no tratamento LB4 ( $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g), apresentando o menor teor desse nutriente, quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 3). Este resultado pode estar relacionado a maior concentração de  $\text{NH}_3/\text{NT}$  encontrada neste tratamento (LB4). KLEINSCHMIT et al. (2005) e RANJIT & KUNG JR (2000) não verificaram diferenças significativas nos teores de PB de silagem de milho, quando utilizaram  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem.

Os teores de EE nas silagens inoculadas com as doses  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem foram significativamente maiores ( $P<0,05$ ) que o teor de EE encontrado na silagem controle, não diferindo das demais (Tabela 3).

Com relação aos constituintes da parede celular (FDN, FDA, HEM e CEL) das silagens, de modo geral, os teores apresentaram-se mais elevados, quando se aplicou o inoculante. Por outro lado, o teor de CNF foi numericamente inferior em todas as

silagens inoculadas, verificando efeito significativo ( $P < 0,05$ ) nas silagens tratadas com  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g (Tabela 3). Os maiores teores dos componentes fibrosos das silagens inoculadas, assim como os menores teores do CNF, podem estar relacionados à fermentação dos carboidratos solúveis (glicose e frutose) pelo *L. buchneri* na formação de lactato, acetato, manitol, dióxido de carbono, água e ATP (McDONALD et al., 1991), uma vez que os carboidratos solúveis estão inseridos dentro dos carboidratos não fibrosos (HALL, 2007).

Tabela 3. Valor nutritivo das silagens de milho em função dos tratamentos.

Variáveis <sup>3</sup>	Tratamentos <sup>1</sup>					Média	CV (%) <sup>2</sup>
	SLB	LB1	LB2	LB3	LB4		
PB (%MS)	9,43 <sup>a</sup>	9,28 <sup>ab</sup>	9,10 <sup>ab</sup>	9,44 <sup>a</sup>	8,80 <sup>b</sup>	9,22	2,25
EE (%MS)	3,14 <sup>b</sup>	3,17 <sup>ab</sup>	3,67 <sup>a</sup>	3,29 <sup>ab</sup>	3,91 <sup>a</sup>	3,26	7,22
FDN (%MS) <sup>4</sup>	38,80 <sup>b</sup>	42,62 <sup>ab</sup>	43,62 <sup>a</sup>	42,15 <sup>ab</sup>	44,50 <sup>a</sup>	42,22	5,08
FDA (%MS)	22,55 <sup>b</sup>	24,81 <sup>ab</sup>	25,81 <sup>ab</sup>	25,13 <sup>ab</sup>	27,27 <sup>a</sup>	24,99	7,31
HEM (%MS)	16,24 <sup>b</sup>	17,81 <sup>a</sup>	17,82 <sup>a</sup>	16,35 <sup>b</sup>	17,23 <sup>ab</sup>	17,09	3,03
CEL (%MS)	17,45 <sup>b</sup>	18,57 <sup>ab</sup>	18,97 <sup>ab</sup>	19,75 <sup>ab</sup>	21,80 <sup>a</sup>	19,18	8,69
LIG (%MS)	2,61 <sup>a</sup>	3,17 <sup>a</sup>	2,74 <sup>a</sup>	2,94 <sup>a</sup>	2,91 <sup>a</sup>	3,13	38,19
CHOT (%MS)	83,93 <sup>a</sup>	84,22 <sup>a</sup>	83,03 <sup>a</sup>	83,49 <sup>a</sup>	84,45 <sup>a</sup>	83,79	1,06
CNF (%MS)	47,11 <sup>ab</sup>	42,21 <sup>ab</sup>	40,08 <sup>b</sup>	41,99 <sup>ab</sup>	40,70 <sup>b</sup>	42,51	6,08
DIVMO (%)	69,14 <sup>a</sup>	65,3 <sup>a</sup>	65,83 <sup>a</sup>	66,61 <sup>a</sup>	67,45 <sup>a</sup>	66,84	3,09
NDT (%)	66,43 <sup>a</sup>	62,53 <sup>a</sup>	62,66 <sup>a</sup>	63,70 <sup>a</sup>	64,56 <sup>a</sup>	63,94	3,66

\*Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

<sup>1</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem.

<sup>2</sup>CV: coeficiente de variação

<sup>3</sup>Matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM), celulose (CEL), lignina (LIG), carboidratos totais (CHOT), carboidratos não fibrosos (CNF), digestibilidade da matéria orgânica (DIVMO) e nutrientes digestíveis totais (NDT).

<sup>4</sup>Os teores de FDN não foram corrigidos para cinzas e proteína.

Em relação aos teores de CHOT, não se verificou diferença significativa entre as silagens. Não foi verificada diferença significativa entre os teores de lignina nas silagens, sendo a média geral de 3,13%MS (Tabela 3), inferior ao valor encontrado por VALADARES FILHO et al. (2006) de  $4,97 \pm 1,82$ .

Os valores de DIVMO e NDT não foram influenciados pelas doses de *L. buchneri*. A DIVMO apresentou média geral de 66,84%, sendo esta maior que a média encontrada na literatura de  $62,26 \pm 3,87\%$  (VALADARES FILHO et al., 2006). O valor médio de NDT (63,94%) apresentou-se dentro da média nacional de  $64,27 \pm 2,87\%$  para

silagem de milho (VALADARES FILHO et al., 2006). MIYASAKI (2008) não verificou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os teores de NDT da silagem de milho (65,33; 66,91; 65,97; 66,46; 66,36 e 65,75%) quando inoculou  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem, respectivamente.

### 3.4. ESTABILIDADE AERÓBIA

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de pH e os teores de ácido acético e láctico em função dos tratamentos e dos tempos de exposição aeróbia. Foram observadas interações significativas ( $P<0,05$ ) entre os tratamentos e os tempos de exposição aeróbia nos valores de pH e nos teores de ácido acético, enquanto que para o teor de ácido láctico não se verificou interação significativa ( $P>0,05$ ).

Tabela 4. Valores de pH e teores de acético das silagens de milho, expressos em porcentagem da MS, em função dos tratamentos e dos dias de exposição aeróbia.

Tempo (dias)	Tratamentos <sup>1</sup>					Médias
	SLB	LB1	LB2	LB3	LB4	
	pH					
0	3,90 <sup>Ba</sup>	4,00 <sup>Ba</sup>	3,95 <sup>Ba</sup>	4,00 <sup>Ba</sup>	4,00 <sup>Ba</sup>	3,95
4	5,43 <sup>Aa</sup>	3,93 <sup>Bb</sup>	4,02 <sup>Bb</sup>	4,16 <sup>Bb</sup>	4,13 <sup>Bb</sup>	4,33
8	5,51 <sup>Aa</sup>	5,73 <sup>Aa</sup>	4,92 <sup>Aa</sup>	4,00 <sup>Bb</sup>	4,71 <sup>ABab</sup>	4,97
12	5,56 <sup>Aa</sup>	5,48 <sup>Aa</sup>	5,72 <sup>Aa</sup>	6,01 <sup>Aa</sup>	5,66 <sup>Aa</sup>	5,67
Médias	5,10	4,79	4,65	4,54	4,60	
CV <sup>2</sup> (%)						5,58
	Ácido acético (%MS)					
0	0,79 <sup>Ab</sup>	1,05 <sup>Aa</sup>	1,22 <sup>Aa</sup>	1,17 <sup>Aa</sup>	1,33 <sup>Ba</sup>	1,11
4	0,47 <sup>Bc</sup>	1,13 <sup>Ab</sup>	1,28 <sup>Ab</sup>	1,18 <sup>Ab</sup>	1,83 <sup>Aa</sup>	1,18
8	0,46 <sup>Bb</sup>	0,40 <sup>Bb</sup>	0,49 <sup>Bb</sup>	0,91 <sup>Aa</sup>	0,49 <sup>Cb</sup>	0,55
12	0,48 <sup>Ba</sup>	0,54 <sup>Ca</sup>	0,52 <sup>Ba</sup>	0,46 <sup>Ba</sup>	0,59 <sup>Ca</sup>	0,52
Médias	0,55	0,78	0,88	0,93	1,06	0,55
CV(%)						59,73
	Ácido láctico (%MS)					
0	6,62	6,70	6,50	6,88	6,47	6,63 <sup>A</sup>
4	5,44	6,68	6,50	5,64	5,76	5,95 <sup>A</sup>
8	3,54	5,58	5,27	5,30	4,38	4,82 <sup>B</sup>
12	3,23	3,64	2,84	3,68	3,41	3,62 <sup>C</sup>
Médias	5,08 <sup>ab</sup>	5,68 <sup>a</sup>	5,40 <sup>ab</sup>	5,75 <sup>a</sup>	4,62 <sup>b</sup>	
CV(%)						11,00

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem pelo Teste Tukey ( $P>0,05$ ).

<sup>2</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem.

<sup>3</sup>CV: coeficiente de variação.

Os valores de pH das silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) somente no oitavo dia exposição aeróbia, exceto o tratamento LB3 ( $5 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem) que permaneceu estável até o oitavo dia de exposição aeróbia. A silagem controle apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) no pH no quarto dia de exposição aeróbia (Tabela 4). FILYA et al. (2006) verificaram que o pH (4,50; 4,28 e 4,25) das silagens de milho inoculadas ( $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g, respectivamente) permaneceram inferiores ( $P < 0,05$ ) ao da silagem controle (5,83) aos cinco dias de exposição aeróbia.

Os teores de ácido acético foram maiores ( $P < 0,05$ ) nas silagens tratadas com *L. buchneri* até o quarto dia de exposição aeróbia, exceto o tratamento LB3 ( $5 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem) que permaneceu com o teor mais elevado deste ácido ( $P < 0,05$ ) até o oitavo dia de exposição (Tabela 5). Os resultados obtidos corroboram aos encontrados por RANJIT & KUNG (2000) que verificaram teores de ácido acético mais elevados nas silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* comparada com a silagem controle por 1,5 e 6 dias aplicando 100.000 e 1.000.000 UFC de *L. buchneri* /g de forragem, respectivamente.

O teor de ácido láctico diminuiu significativamente com o passar dos dias de exposição aeróbia. Com relação aos tratamentos, as silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentaram maior teor de ácido láctico até o oitavo dia de exposição aeróbia, embora não significativo. RANJIT & KUNG JR (2000) verificaram em silagem de milho inoculada com  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g maiores concentrações de ácido láctico até o 6º dia de exposição aeróbia.

A composição microbiológica das silagens de milho em função dos tratamentos e dos dias de exposição está apresentada na Tabela 5. Verificou-se interação significativa ( $P < 0,05$ ) entre as silagens e os tempos de exposição aeróbia na contagem de leveduras.

Verificou-se menor ( $P < 0,05$ ) número de leveduras até o quarto dia de exposição aeróbia nas silagens inoculadas com  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem (LB2, LB3 e LB4) comparadas com a silagem sem inoculação. Neste mesmo tempo, o tratamento LB1 ( $5 \times 10^4$  UFC/g), mesmo sem diferença significativa ( $P > 0,05$ ), apresentou contagem de leveduras consideravelmente inferior comparado ao controle

(Tabela 5). FILYA et al. (2006) verificaram que a inoculação de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de silagem de milho reduziram para 2,36; 1,93 e 1,88 log UFC de leveduras/g de silagem, respectivamente comparado a 5,88 UFC de leveduras/g da silagem controle.

Tabela 5. Composição microbiológica das silagens de milho em função dos tratamentos e dos dias de exposição.

Tempo (dias)	Tratamentos <sup>1</sup>					Médias
	SLB	LB1	LB2	LB3	LB4	
	Leveduras (Log UFC g <sup>-1</sup> de silagem)					
0	4,71 <sup>Ba</sup>	1,71 <sup>Bb</sup>	1,70 <sup>Bb</sup>	1,24 <sup>Cb</sup>	2,31 <sup>Cb</sup>	2,33
4	8,45 <sup>Aa</sup>	6,96 <sup>Aab</sup>	6,47 <sup>Ab</sup>	5,53 <sup>Bb</sup>	6,27 <sup>Bb</sup>	6,74
8	7,82 <sup>Aa</sup>	8,02 <sup>Aa</sup>	7,80 <sup>Aa</sup>	7,61 <sup>Aa</sup>	7,68 <sup>BCa</sup>	7,78
12	8,50 <sup>Aa</sup>	8,74 <sup>Aa</sup>	8,15 <sup>Aa</sup>	8,50 <sup>Aa</sup>	8,55 <sup>Aa</sup>	8,49
Médias	7,37	6,36	6,03	5,72	6,20	
CV(%) <sup>2</sup>						9,69
	Fungos filamentosos (Log UFC g <sup>-1</sup> de silagem)					
0	3,71	2,97	2,45	2,97	2,69	2,96 <sup>D</sup>
4	4,69	3,89	3,97	3,34	2,71	3,72 <sup>C</sup>
8	7,10	5,17	4,53	4,77	4,38	5,19 <sup>B</sup>
12	7,66	6,63	6,45	6,26	6,32	6,66 <sup>A</sup>
Médias	5,79 <sup>a</sup>	4,66 <sup>b</sup>	4,35 <sup>b</sup>	4,34 <sup>b</sup>	4,03 <sup>b</sup>	
CV(%)						15,97

\*Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem pelo Teste Tukey (P>0,05).

<sup>1</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem.

<sup>2</sup>CV: coeficiente de variação.

Não foi verificada interação significativa (P>0,05) entre as silagens e os dias de exposição aeróbia na contagem de fungos filamentosos. Entretanto, verifica-se na Tabela 5, que todas as silagens inoculadas com *L. buchneri* a presença de fungos filamentosos foi numericamente reduzida comparada à da silagem controle nos tempos avaliados.

Analisando somente os efeitos principais, as silagens inoculadas com *L. buchneri* (LB1, LB2, LB3 e LB4) apresentaram contagem de fungos filamentosos inferior (P<0,05) a silagem não tratada (Tabela 5). No decorrer dos dias de exposição aeróbia a contagem de fungos filamentosos aumentou significativamente (P<0,05). FILYA et al. (2006) não verificaram diferença significativa (P>0,05) entre as contagens de fungos filamentosos nas silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* e a silagem controle na

abertura dos silos e aos cinco dias de exposição aeróbia. FILYA (2003) verificou contagem de fungos filamentosos ( $<2,0$  Log UFC/g) numericamente inferior na silagem de milho inoculada com  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem comparada à silagem controle (3,45 Log UFC/g) aos cinco dias de exposição aeróbia.

Após a abertura do silo, a silagem é inevitavelmente exposta ao oxigênio e o substrato é consumido pelos microorganismos aeróbios. Em condições aeróbias, muitos microorganismos podem se multiplicar, apesar de terem permanecido inativos na ausência de oxigênio (NISHINO et al. 2003). As leveduras assimiladoras de lactato (*Cândida* e *Hansenula*) degradam o ácido láctico em dióxido de carbono e água, produzindo um calor excessivo conduzindo a perda de nutrientes. A degradação do ácido láctico causa aumento do pH da silagem a um nível que permite o crescimento de bactérias oportunistas (*Acetobacter* e *Bacillus*) e fungos filamentosos (*Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*), reduzindo a qualidade sanitária da silagem (McDONALD et al. 1991).

Nos resultados da presente pesquisa, pode-se verificar nas silagens tratadas em que os ácidos, acético e láctico, permaneceram elevados por um maior tempo de exposição aeróbia o pH se manteve estável. Tais fatos justificam a menor presença de leveduras e fungos filamentosos nestes tratamentos, uma vez que o ácido acético pode inibir a proliferação destes microorganismos (MOON, 1983). Segundo DAVIDSON (1997), o ácido acético em pH inferior ao seu pKa (4,73) permanece na forma não dissociada, onde a membrana dos microorganismos se torna permeável a ele, ocorrendo a entrada do ácido na célula via transporte passivo. Dentro da célula, o ácido é dissociado ( $\text{RCOO}^- + \text{H}^+$ ), devido ao pH ser próximo de 7,0, assim íons  $\text{H}^+$  são liberados, reduzindo o pH intracelular. Para manter o pH intracelular constante o microorganismo deve eliminar os íons  $\text{H}^+$ , perdendo energia e retardando o crescimento, podendo chegar à morte. Com o controle dos fungos pelo ácido acético, o ácido láctico permanece na silagem, deixando de ser consumido por esses microorganismos mantendo o pH estável por maior tempo.

A deterioração aeróbia está associada com diminuição dos carboidratos solúveis e ácido láctico; aumento do pH, do número de leveduras e fungos filamentosos (WEINBERG et al., 1993) e da temperatura (PAHLOW et al. 2003). Tipicamente, um ou

dois picos de temperatura são encontrados por causa da atividade dos fungos (HARA et al. 1979).

A variação da temperatura ambiente, da silagem controle e das silagens tratadas em função das horas de exposição aeróbia está apresentada na Figura 3. A silagem controle apresentou um pico de temperatura de 24 a 72 horas, atingindo 32°C, aproximadamente 8°C acima da temperatura ambiente, enquanto que as silagens inoculadas com *L. buchneri* não apresentaram picos de temperatura, permanecendo próximas da temperatura ambiente. Tais resultados corroboram com os obtidos por NISHINO et al. (2003), que verificaram um pico de temperatura da silagem controle de 24 a 72 horas, atingindo 34°C, enquanto que a silagem de milho tratada com  $4,4 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem não apresentou pico de temperatura.

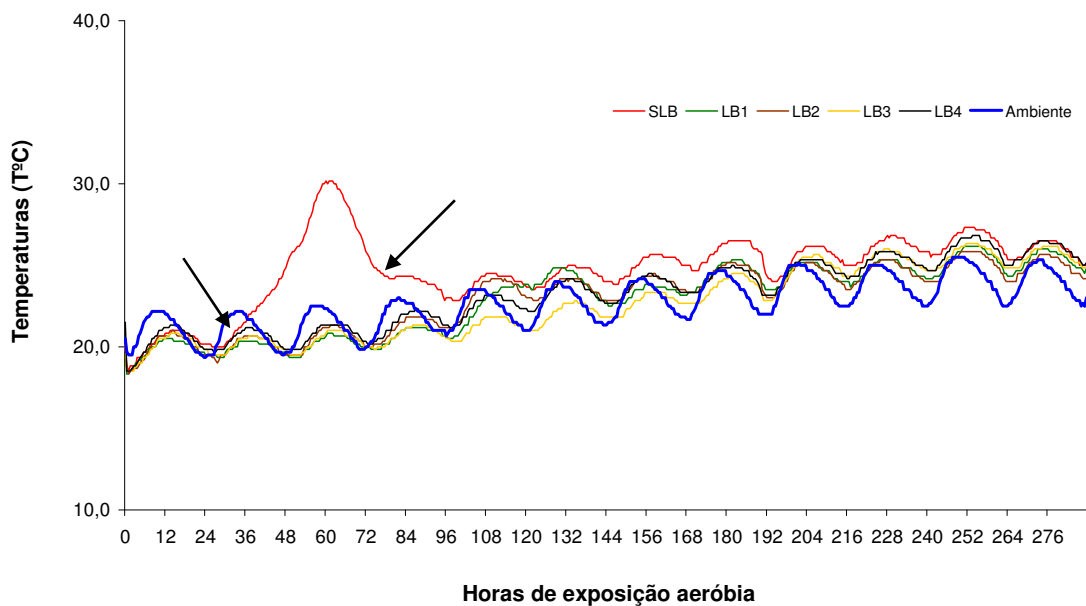


Figura 3. Temperatura ambiente e das silagens de milho submetidas às doses de *L. buchneri* em função das horas de exposição aeróbia.

\*SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem.

Segundo KUNG JR. et al. (2003) a quebra da estabilidade aeróbia é definida como o número de horas que a temperatura da silagem exposta ao ar demora a atingir 2°C acima da temperatura do ambiente. Na Figura 4, está apresentado o efeito das

doses de *L. buchneri* sobre a quebra da estabilidade aeróbia, em horas, das silagens de milho. Observa-se que a aplicação de *L. buchneri*, independente da dose, melhorou ( $P < 0,05$ ;  $CV = 8,81\%$ ) a estabilidade aeróbia da silagem de milho, ocorrendo a quebra da estabilidade a partir de 151,7 horas (LB2), ou seja, 105,4 horas acima da silagem controle. O tratamento LB3 ( $5 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem) permaneceu estável por maior tempo (223 h). RANJIT et al. (2002) verificaram que as doses de  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem mantiveram a estabilidade aeróbia da silagem de milho acima de 572 horas. RANJIT & KUNG JR (2000) verificaram que a silagem de milho inoculada com a dose de  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem permaneceu estável por mais de 900 horas, enquanto que a silagem controle e a inoculada com  $1 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem mantiveram a estabilidade aeróbia por apenas 26,5 e 36 horas, respectivamente.

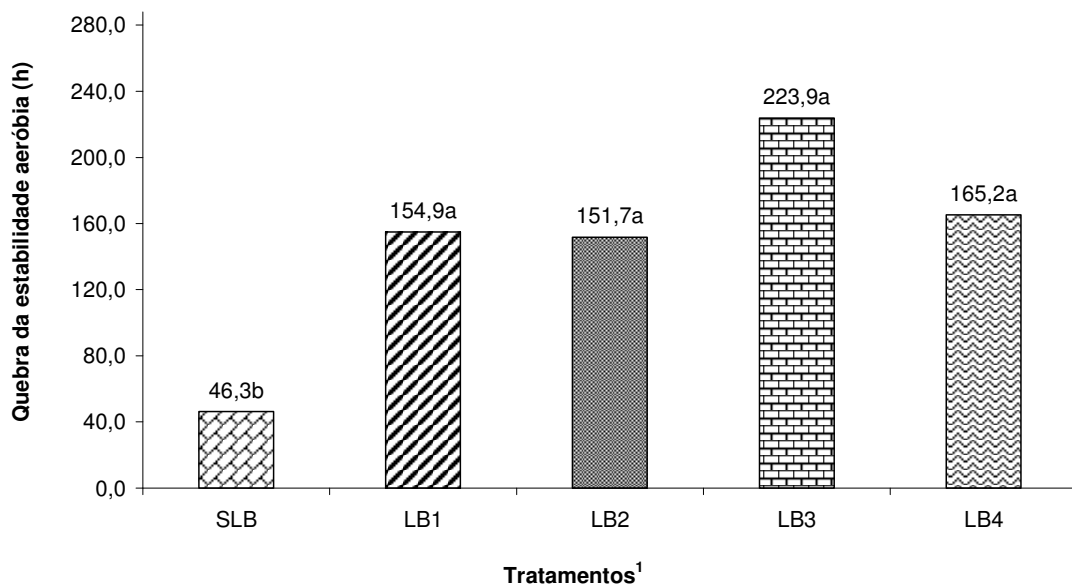


Figura 4. Efeito de doses de *L. buchneri* sobre a quebra da estabilidade aeróbia das silagens de milho.

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

<sup>1</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem.

#### 4. CONCLUSÕES

O *Lactobacillus buchneri* é eficiente na proteção contra leveduras e fungos filamentosos em silagem de milho, melhorando a estabilidade aeróbia da silagem, em condições de laboratório. O valor nutricional da silagem de milho não é afetado pela adição do inoculante.



## 5. REFERÊNCIAS

- COMBS, D.K; HOFFMAN, P.C. Lactobacillus Buchneri of the aerobic stability in the silage. Focus on Forage. **University of Wisconsin Board of Regents**, v.3, n.14, 2001.
- DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTEVILLE, T. J. (Eds) **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 1997, p. 520-556.
- DRIEHUIS, F.; SPOLESTRA, S.F.; COLE, S.C.J.; MORGAN, R. Improving aerobic stability by inoculation with *Lactobacillus buchneri*. In: The International Silage Conference, 11th, 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth, 1996, p.106-107.
- DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, W.H., SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p. 583-594, 1999.
- DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, W.H.; Van WIKSELAAR, P.G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculant with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v. 56, p. 330-343, 2001.
- FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Dairy Science**, v.86, n. 11, p.3575-3581, 2003.
- FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. **Journal of applied microbiology**, v.101, p. 1216-1223, 2006.
- HALL, M.B. Methodological challenges in carbohydrate analyses. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36 (suplemento), p. 359-367, 2007.
- HARA, S.; ITOH, M.; OHYAMA, Y. Aerobic deterioration of silages and changes in temperature, gás metabolism, heat production and micro-flora. **Japanese Journal of Zootechnical Science**, v. 59, p. 549-556, 1979.

HIGGINBOTHAM, G.E.; MUELLER, S.C.; BOLSEN, K.K.; DePETERS, E.J. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2185-2192, 1998.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, R.A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36 (suplemento), p. 101-120, 2007.

KLEINSCHMIT, D.H.; KUNG, Jr. L. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2130-2139, 2006.

KLEINSCHMIT, D.H.; SCHMIDT, R.J.; KUNG, Jr. L. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4005-4013, 2005.

KUNG JR., L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W. HUBER, J.T. Added ammonia or microbial inoculant for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.299-306, 1984.

KUNG JR., L.; SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. Focus on Forage. **University of Wisconsin Board of Regents**, v.3, n.13, 2001.

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

KUNG JR., L. The aerobic stability of silages. In: 2nd International Symposium on Animal Production under Grazing, 2008, Viçosa, Brazil. **Proceedings ... Viçosa**, 2008. p. 233-248.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN; E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU M. K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n.4, p. 321-330, 1999.

MARI, L.J. **Intervalos entre cortes em capim-marandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A.Rich.) Stapf cv. Marandu): produção, valor nutritivo e perdas associadas à fermentação da silagem.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 159p., 2003.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, n.6, p.1212-1240, 2002.

MIYASAKI, M. K. **Uso de aditivo microbiano e de filme plástico no controle da fermentação e da deterioração aeróbia de silagem de milho.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 92p., 2008.

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

McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage.** 2.ed. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7. ed. Washinton, D.C.: 2001. 381p.

NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H.; SAKAGUSHI, E. 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, p. 800-807, 2003.

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

PAHLOW, G; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds).

**Silage Science and Technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-94.

PARKER, R.B. **Methodology for determining quality of silage**. National Feed Ingredients Association, 1979. 33p.

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

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

SILVA, D.J., QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos (Métodos Químicos e Biológicos)**. UFV, Imprensa Universitária, 2002. 235p.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D., VAN SOEST, P.J., FOX, D.G., RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating diets II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 3562-3577, 1992.

VALADARES FILHO, S.C.; MAGALHÃES, K.A.; ROCHA JUNIOR, V.R.; CAPELLE, E.R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 329p.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. Analysis of forages and fibrous foods. Cornell University, 1985. 202p.

VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminantes**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 98p, 1980.

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

WEINBERG, Z. G.; ASHBELL, G.; HEN, Y. et al. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 512-518, 1993.

WEISS, W.P. Predicting Energy Values of Feed. In. Symposium: Prevailing concepts in energy utilization by ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 1802-1811, 1993.

WILSON, R.K. A rapid accurate method for measuring volatile fatty acids and lactic acid in silage. Ruakura: **Animal Research Institute**, 1971. p.1-12 (Research Report).

WOOLFORD, M. K. The detrimental effect of air on silage. **Journal Applied Bacteriology**.68:101–116, 1975.

### **CAPÍTULO 3 –ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGEM DE GRÃOS ÚMIDOS DE MILHO INOCULADA COM *Lactobacillus buchneri*.**

**RESUMO** – O *Lactobacillus buchneri* tem sido testado com o intuito de melhorar a estabilidade aeróbia das silagens reduzindo o crescimento de fungos. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos de doses de *Lactobacillus buchneri* sobre as características fermentativas, valor nutritivo, dinâmica microbiológica e estabilidade aeróbia de silagens de grãos úmidos de milho. Os tratamentos foram controle (sem *L. buchneri* - SLB),  $5 \times 10^4$  (LB1),  $1 \times 10^5$  (LB2),  $5 \times 10^5$  (LB3) e  $1 \times 10^6$  (LB4) UFC de *L. buchneri*/g de massa de grãos, avaliados nos 0, 4, 8 e 12 dias de exposição aeróbia. Após 140 dias de fermentação, os silos foram abertos, retiradas amostras da silagem para avaliações dos valores de pH; os teores de MS, ácidos orgânicos, nitrogênio amoniacal; desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos e valor nutricional, além da avaliação da temperatura para caracterizar a estabilidade aeróbia. Não foram verificadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os teores de MS. Os valores de pH diferiram, significativamente entre as silagens na fase de fermentação, sendo os maiores valores encontrados nas silagens SLB e LB1. Durante a exposição aeróbia, os valores de pH aumentaram, entretanto, nas silagens inoculadas os valores de pH foram numericamente inferiores ao da silagem controle até o 12º dia de exposição aeróbia. Os teores dos ácidos orgânicos não diferiram entre as silagens ( $P > 0,05$ ). As contagens dos fungos foram menores nas silagens inoculadas com *L. buchneri*, principalmente em silagens com doses mais elevadas (LB3 e LB4), melhorando a estabilidade aeróbia. A inoculação de *L. buchneri* controla o crescimento de leveduras e fungos filamentosos em silagem de grãos úmidos de milho, melhorando a estabilidade aeróbia da silagem, em condições de laboratório, principalmente com a utilização de doses acima de  $5 \times 10^5$  UFC/g. O valor nutricional da silagem não foi afetado pela adição do inoculante.

## 1. INTRODUÇÃO

A silagem de grãos úmidos de milho está sendo cada vez mais utilizada no Brasil, para alimentação de suínos, gado de corte e de leite. A confecção de silagens de grãos úmidos de milho permite aos produtores adiantar a época de colheita do milho, aumentando a flexibilidade na colheita do grão e economizar com o custo de secagem, entretanto as perdas podem ser aumentadas se não houver um armazenamento correto destas silagens, contudo estas perdas podem ser minimizadas com um planejamento adequado (BUCHANAN-SMITH et al., 2003).

Segundo JOBIM et al. (2003), a maioria das silagens de grãos úmidos deterioram com menos de 24 horas após a exposição ao oxigênio. A deterioração aeróbia da silagem está associada principalmente ao desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos (MUCK et al., 1991). As leveduras degradam ácido láctico, entre outros produtos da fermentação, em dióxido de carbono e água, causando um aumento no pH, possibilitando o crescimento de microrganismos indesejáveis na silagem, bem como perdas de MS (JOBIM et al., 2003). Os fungos filamentosos degradam uma ampla variedade de nutrientes (carboidratos estruturais e lignina), além de indesejáveis em razão da produção de micotoxinas (McDONALD et al., 1991).

Com o objetivo de sanar este problema, pesquisadores buscaram formas de se mitigar a deterioração aeróbia, pelo do uso de inoculantes microbianos heteroláticos, que são de fácil utilização, não são corrosivos ao maquinário, bem como não poluem o ambiente. Esses inoculantes, pela fermentação dos carboidratos solúveis, produzem ácidos orgânicos voláteis, que tem efeito antifúngico (MOON, 1983).

Até a metade da década de 90 o principal enfoque das indústrias de inoculantes era desenvolver tecnologias a base de bactérias homofermentativas. Contudo, estratégias como utilização de inoculantes bacterianos heterofermentativos (*Lactobacillus buchneri*), tem sido estudadas como alternativa para melhorar a estabilidade aeróbia das silagens, reduzindo o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, pela produção de ácido acético, o qual tem efeito antifúngico (MUCK, 1996).

O *Lactobacillus buchneri* é usado em silagens de capins, leguminosas, milho, sorgo e grãos úmidos. Entretanto, silagens de planta e grãos úmidos de milho são mais

susceptíveis a deterioração aeróbia do que as de leguminosas e capim, assim a inoculação com *L. buchneri* pode ser um benefício (COMBS & HOFFMAN, 2001).

A melhora na estabilidade aeróbia de silagens de grãos úmidos de milho foi relatada em estudos como o de TAYLOR & KUNG JR (2002) que avaliaram as doses de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $6,6 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de silagens de grãos úmidos e observaram que a estabilidade aeróbia foi de 79, 333, 400 e 371 horas, respectivamente, sendo a silagem sem inoculante estável somente até 47 horas.

REIS et al. (2008) estudaram as concentrações de  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  UFC *L. buchneri*/g em silagens de grãos úmidos de milho e verificaram melhora na estabilidade aeróbia das silagens de 126,5; 239,3; 240,5 e 265,0 horas, respectivamente, comparado as 68 horas de estabilidade aeróbia da silagem controle.

Contudo, poucos estudos têm sido realizados no Brasil e no mundo a respeito do uso do *L. buchneri* em silagens de grãos úmidos de milho. Neste contexto, objetivou-se avaliar os efeitos de doses de *Lactobacillus buchneri* sobre as características fermentativas, o valor nutritivo, a dinâmica microbiana e a estabilidade aeróbia de silagens de grãos úmidos de milho.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no setor de Forragicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal - SP, localizada a  $21^{\circ}15'22''$  de latitude sul,  $48^{\circ}18'58''$  de longitude oeste e 595 metros de altitude, onde o clima na região é subtropical do tipo AWA de acordo com a classificação de Köppen.

O híbrido de milho utilizado foi o Maximus (Syngenta), grão semi-duro, de ciclo precoce, semeado em 14 de dezembro de 2007 em Latossolo Vermelho eutrófico. Para adubação de semeadura foi utilizado  $300 \text{ kg ha}^{-1}$  da fórmula 8-20-20 (N, P, K) e na adubação cobertura foi utilizado  $400 \text{ kg ha}^{-1}$  da fórmula 20-0-20 (N, P, K). Os grãos foram colhidos em 15 de abril de 2008, logo após a maturidade fisiológica (umidade média de 34%). Utilizou-se uma máquina colhedora autopropelida de grãos, marca John Deere, modelo 1165, para tal procedimento. Os grãos colhidos foram triturados em moinho estacionário com peneira de 10mm.



Os grãos moídos foram ensilados após a aplicação das doses do inoculante, sendo este diluído em água destilada, pulverizado com auxílio de borrifador manual sobre a massa e posteriormente homogeneizados. Na silagem controle (sem inoculante) foi pulverizado apenas o mesmo volume de água destilada.

Os tratamentos foram diferentes concentrações do inoculante bacteriano *Lactobacillus buchneri* (Cepa NCIMB 40788), encontrado comercialmente como LalsilCana®, apresentado na forma de pó e embalado em sachê (100 gramas de produto, contendo  $2,5 \times 10^5$  UFC/ g de produto) recomendado para inocular 50 toneladas de material forrageiro.

Os tratamentos utilizados foram os seguintes:

**SLB** - Grãos úmidos de milho sem inoculante (controle);

**LB1** - Grãos úmidos de milho inoculado com  $5 \times 10^4$  UFC de *L. buchneri*/ g;

**LB2**- Grãos úmidos de milho inoculado com  $1 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/ g;

**LB3** - Grãos úmidos de milho inoculado com  $5 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/ g;

**LB4** - Grãos úmidos de milho inoculado com  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/ g.

## 2.1. ENSILAGEM

Como silos experimentais foram utilizados baldes plásticos, com capacidade de 7L. A compactação foi realizada com auxílio de bastões de ferro, visando a atingir uma massa específica de  $900 \text{ kg/m}^3$ . Após a compactação, os silos foram fechados com tampa plástica, lacrados com fita adesiva, pesados e armazenados em temperatura ambiente durante 140 dias.

No momento da ensilagem após a aplicação dos inoculantes foram retiradas três amostras de cada repetição para determinação química (pH), microbiológica (leveduras e fungos filamentosos) e valor nutricional.

## 2.2. ABERTURA

Após 140 dias de fermentação, anteriormente à abertura, os silos experimentais foram pesados para determinação das perdas por gases, bem como a recuperação de matéria seca. Após a abertura, descartou-se o material deteriorado, o restante

(aproximadamente 3 kg de silagem) foi homogeneizado, amostrado e colocado em baldes plásticos (7 L) acondicionados em uma sala fechada em temperatura ambiente para avaliação da estabilidade aeróbia por 12 dias (288 horas).

Nos dias 0 (momento da abertura), 4, 8 e 12 após a abertura foram retiradas três amostras de cada repetição para determinação química (pH, ácidos orgânicos voláteis e ácido lático) e microbiológica (leveduras e fungos filamentosos), sendo a determinação do valor nutricional e do nitrogênio amoniacal realizada somente nas amostras coletadas no dia 0.

### 2.3. PERDAS POR GASES

A quantificação de perda por gases foi calculada pela equação descrita por MARI (2003):

$$PG (\%) = [(PSI - PSF) / MSI] \times 100, \text{ sendo,}$$

PG: produção de gases;

PSI: peso do silo no momento da ensilagem (kg);

PSF: peso do silo no momento da abertura (kg);

MSI: matéria seca ensilada (quantidade de forragem (kg) x % matéria seca).

### 2.4. RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA SECA

Para a determinação da recuperação da matéria seca foi utilizada a equação descrita por JOBIM et al. (2007):

$$RMS (\%) = \frac{MSF}{MSI} \times 100$$

RMS: recuperação da matéria seca;

MSF: matéria seca no momento da abertura (quantidade de massa (kg) x % matéria seca);

MSI: matéria seca ensilada (quantidade de massa (kg) x % matéria seca).

### 2.5. ANÁLISES QUÍMICO-BROMATOLÓGICAS

Das amostras frescas de silagem foi elaborado extrato aquoso segundo KUNG JR et al. (1984) para determinar os valores de pH com uso de um peagâmetro digital, a

concentração de N amoniacal mediante a destilação com hidróxido de potássio 2N conforme técnica descrita por FENNER (1965) adaptada por VIEIRA (1980), os teores dos ácidos orgânicos voláteis por meio de cromatografia gasosa (WILSON, 1971) e os teores de ácido láctico por meio de espectrofotometria colorimétrica (SILVA & QUEIROZ, 2002).

Outra amostra foi utilizada para determinação do valor nutricional da silagem. Para tanto, esta amostra foi colocada em saco de papel, pesada e levada para estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 horas. Após esse período foi pesada novamente, moída em moinho de faca até o tamanho das partículas atingirem menos de 1 mm e armazenadas em potes de plástico.

Os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), nitrogênio total (NT) e extrato etéreo (EE) foram determinados conforme método descrito por SILVA & QUEIROZ (2002), sendo a proteína bruta (PB) obtida pelo produto entre o nitrogênio total e o fator 6,25.

Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidos de acordo com MERTENS (2002), sem o uso de sulfito de sódio e utilizando-se amilase termoestável. A fibra em detergente ácido (FDA) foi avaliada pelo método de VAN SOEST & ROBERTSON (1985).

A digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) e os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram determinados pela técnica da produção de gases, de acordo com a metodologia descrita por MENKE & STEINGASS (1988) modificada por MAURICIO et al. (1999), em que o valor energético é predito através do gás produzido durante a incubação *in vitro* de amostras de alimentos juntamente com fluido ruminal. Cerca de 200 mg de amostra de silagem foram incubadas em frascos de vidro (115 mL). Frascos contendo somente líquido ruminal e meio de cultura (tampão) foram usados como branco. Em cada frasco, foram adicionados 30 mL de meio de incubação. O líquido ruminal foi obtido de um novilho mestiço fistulado, recebendo dieta à base de capim braquiária e concentrado. Os frascos foram vedados com tampas de borracha e selados com lacres de alumínio e colocados em banho-maria 39°C. A pressão originada pelos gases acumulados na parte superior dos frascos foi medida por um transdutor de pressão conectado a um leitor digital. As leituras foram efetuadas com maior frequência

durante o período inicial de fermentação e reduzidas posteriormente (2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 48, 52, 56, 60 e 72 horas). A pressão formada no interior dos frascos foi medida através da inserção de uma agulha acoplada ao transdutor à tampa de borracha e posteriormente transformada em volume, segundo a seguinte equação obtida em ensaio laboratorial  $y = 5,5452x - 0,1569$  ( $r^2 = 0,9997$ ), em que Y é o volume de gás (mL) e X é a pressão (psi).

Foram utilizadas as seguintes equações para estimativa da DIVMO e NDT:

$$\text{DIVMO (\%)} = 14,88 + ((0,889 \cdot \text{gás}_{24}) + (0,045 \cdot \text{PB}) + (0,065 \cdot \text{MM}))$$

$$\text{EM (MJ/kg MS)} = 2,20 + (0,136 \cdot \text{gás}_{24}) + (0,0057 \cdot \text{PB}) + (0,00029 \cdot \text{EE})$$

Onde, EM é a energia metabolizável; gás<sub>24</sub> é a produção de gás *in vitro* em 24h (ml/0,2 g de MS) e os valores de PB, MM e EE são expressos em g/kg de MS. Posteriormente, esses valores foram convertidos em NDT por meio dos seguintes fatores:

$$\text{ED (Mcal/kg MS)} = \text{EM}/0,82$$

$$\text{NDT (\%)} = \text{ED}/4,409 \cdot 100 \text{ (NRC, 2001)}.$$

## 2.6. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Foram pesados 25 g de amostra fresca, adicionado 225 mL de solução peptonada 0,1% (0,1 g de peptona por litro de água destilada). Após agitação manual foi retirado 1 mL do extrato para as diluições ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ) em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril (8,5 g de NaCl/litro de água destilada). Foi semeado 0,1 mL das diluições em placas de Petri descartáveis contendo o meio ágar batata acidificado (Difco) em duplicata (PARKER, 1979). As placas foram incubadas em aerobiose a 28°C por 48 e 96 horas, conforme HIGGINBOTHAM et al (1998), quando então foi procedida a contagem das colônias de leveduras e fungos, respectivamente. Os números de microrganismos foram contados como unidade formadora de colônias (UFC) e transformados em logaritmo na base 10.

## 2.7. ESTABILIDADE AERÓBIA

Nos baldes destinados à avaliação da estabilidade aeróbia foi realizada a leitura da temperatura, registrada a cada meia hora por meio de um *data logger* inserido no centro da massa. A temperatura ambiente foi medida por meio de *data logger* distribuídos próximo aos baldes. A quebra da estabilidade aeróbia foi calculada como o tempo gasto em horas, para que a temperatura da silagem se eleve em 2°C acima da temperatura do ambiente (KUNG JR et al., 2003).

## 2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Para o estudo da estabilidade aeróbia utilizou-se o modelo de medidas repetidas no tempo com três repetições por tratamento.

$$\text{Modelo: } Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + T_i \times H_j + R_k(T_i) + E_{ijk}$$

Onde:

- $\mu$  = média geral;
- $T_i$  = efeito fixo do tratamento;
- $H_j$  = efeito fixo do tempo de exposição aeróbia;
- $T_i \times H_j$  = efeito da interação tratamento x tempo de exposição aeróbia;
- $R_k(T_i)$  = Repetição aninhada com tratamento e;
- $E_{ijk}$  = efeito residual.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. CARACTERIZAÇÃO INICIAL DO GRÃO DE MILHO MOÍDO

A caracterização inicial dos grãos úmidos de milho na pré-ensilagem em função dos tratamentos está apresentada na Tabela 1. Os teores de MS e os valores de pH ficaram a baixo do encontrado por TAYLOR & KUNG JR (2002) em grãos úmidos de milho (MS: 74%; pH: 6,1). Enquanto que os teores de PB, e as contagens dos microrganismos encontrados foram maiores do que os obtidos por KUNG JR et al.

(2007) em grãos úmidos de milho na pré-ensilagem (PB: 9,64%MS; Leveduras: 3,52 log<sub>10</sub> UFC/g; Fungos filamentosos: 3,34 log<sub>10</sub> UFC/g)

Os teores de FDN e FDA dos grãos úmidos de milho na pré-ensilagem variaram de 8,45 a 9,08% e 1,20 a 2,65%, respectivamente. Os teores de FDN obtidos foram maiores aos encontrados por KUNG JR et al. (2007) (7,92%), enquanto que os de FDA foram menores aos obtidos pelos referidos autores (2,55%).

Tabela 1. Caracterização inicial dos grãos úmidos de milho na pré-ensilagem em função dos tratamentos.

Variáveis <sup>1</sup>	Tratamentos <sup>2</sup>				
	SLB	LB1	LB2	LB3	LB4
MS (%)	64,95±1,11	65,13±0,99	65,63±0,45	65,85±0,09	65,53±0,08
PB (%)	11,61±0,38	11,87±0,32	11,59±0,35	11,92±0,24	11,61±0,31
pH	5,57±0,06	5,6±0,06	5,39±0,06	5,53±0,03	5,18±0,07
Leveduras (Log UFC/g)	6,40±0,53	7,26±0,73	6,93±0,23	6,76±0,10	6,88±0,40
Fungos Filamentosos (Log UFC/g)	3,86±0,54	5,18±0,16	5,25±0,15	5,11±0,06	5,05±0,28

<sup>1</sup>MS: matéria seca total; PB: proteína bruta; pH: potencial hidrogeniônico.

<sup>2</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 - 5x10<sup>4</sup>, LB2 - 1x10<sup>5</sup>, LB3 - 5x10<sup>5</sup>, LB4 - 1x10<sup>6</sup> UFC de *L. buchneri* /g de forragem.

### 3.2. PERDAS POR GASES E RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA SECA

Os resultados referentes às perdas por gases na fermentação são apresentados na Figura 1. Foram verificadas baixas e não significativas perdas por gases ( $P > 0,05$ ; CV= 61,73%) entre as silagens. Tais resultados corroboram com REIS et al (2008) que também observaram baixas perdas sem diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) em silagens de grãos úmidos de milho quando utilizaram 5x10<sup>4</sup> (2,69%), 1x10<sup>5</sup> (2,99%), 2x10<sup>5</sup> (2,78%) e 4x10<sup>5</sup> (2,93%) UFC de *L. buchneri* /g comparado com a silagem controle (2,01%).

O efeito das doses de *L. buchneri* sobre a recuperação de MS (RMS) das silagens de grãos úmidos de milho após a fermentação são apresentados na Figura 2. Não se verificaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ , CV= 1,61%) entre as silagens. Os resultados obtidos na presente pesquisa são semelhantes aos de TAYLOR & KUNG JR (2002) que também não observaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) na recuperação de MS entre as silagens inoculadas com 1x10<sup>5</sup> (99%), 5x10<sup>5</sup> (98%), 6,6x10<sup>5</sup> (98%) e

$1 \times 10^6$  (98%) UFC de *L. buchneri*/g de silagem de grãos úmidos de milho e a controle (99%) aos 166 dias de ensilagem.

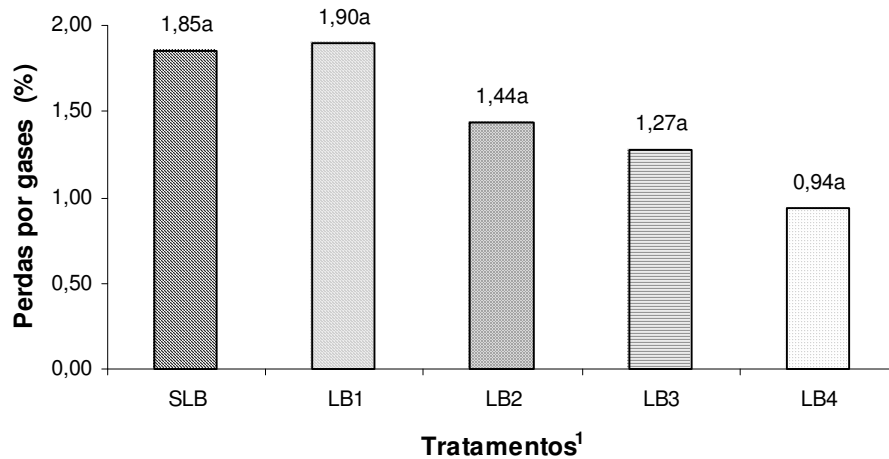


Figura 1. Efeito de doses de *L. buchneri* sobre as perdas por gases das silagens de grãos úmidos de milho, expressas em porcentagem. Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

<sup>1</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de massa de grãos.

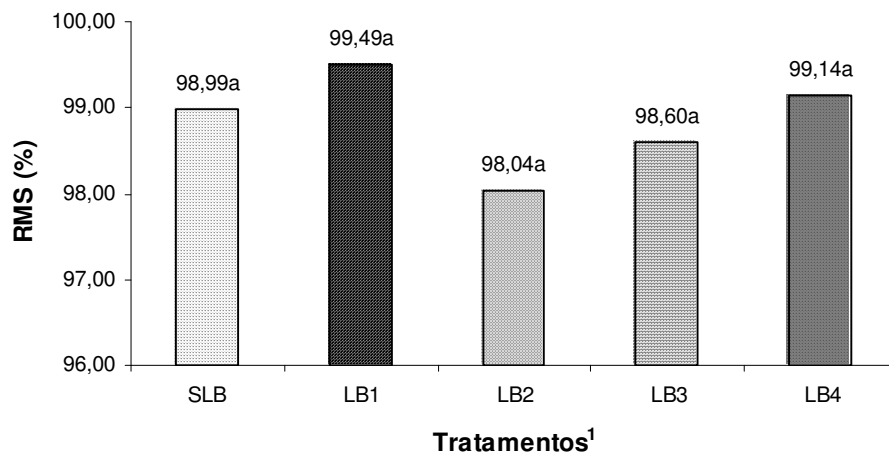


Figura 2. Efeito de doses de *L. buchneri* sobre recuperação da matéria seca (RMS) das silagens de grãos úmidos de milho, expressa em porcentagem da matéria seca ensilada. Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

<sup>1</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de massa de grãos.

As baixas perdas por gases e a alta recuperação de MS, sem diferença significativas entre as silagens, podem ser considerados aspectos positivos, uma vez que a fermentação heterofermentativa resulta em maiores perdas por CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O e menor recuperação de MS (McDONALD et al., 1991).

### 3.3. CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS E VALOR NUTRICIONAL DA SILAGEM

As características fermentativas das silagens de grãos úmidos de milho após 140 dias de ensilagem, em função dos tratamentos, estão apresentadas na Tabela 2. Não se verificou diferença significativa ( $P>0,05$ ) no teor de MS das silagens de grãos úmidos de milho. REIS et al. (2008) também não observaram diferenças significativas nos teores de MS das silagens de grãos úmidos quando inocularam  $5 \times 10^4$  (65,22%),  $1 \times 10^5$  (65,33%),  $2 \times 10^5$  (64,76%) e  $4 \times 10^5$  (65,49%) UFC de *L. buchneri*/g de grãos úmidos comparado com a silagem controle (65,83%). KUNG JR et al. (2007) verificaram diferença significativa nos teores de MS entre a silagem de grãos úmidos de milho (71,2%) inoculada com  $6,6 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/g e a controle (71,5%), mas os autores não consideraram este resultado biologicamente significativo.

Tabela 2. Características fermentativas da silagem de grãos úmidos de milho após 140 dias de fermentação.

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>					Média	CV (%) <sup>3</sup>
	SLB	LB1	LB2	LB3	LB4		
MS (%)	66,28 <sup>a</sup>	66,66 <sup>a</sup>	66,07 <sup>a</sup>	66,61 <sup>a</sup>	66,42 <sup>a</sup>	66,40	0,77
pH	3,98 <sup>a</sup>	3,98 <sup>a</sup>	3,90 <sup>b</sup>	3,90 <sup>b</sup>	3,90 <sup>b</sup>	3,93	0,80
NH <sub>3</sub> /NT <sup>2</sup>	2,38 <sup>a</sup>	2,65 <sup>a</sup>	3,24 <sup>a</sup>	2,86 <sup>a</sup>	2,60 <sup>a</sup>	2,75	15,11
Ácido láctico (%MS)	3,90 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>	3,84 <sup>a</sup>	3,16 <sup>a</sup>	3,61 <sup>a</sup>	3,64	11,66
Ácido acético (%MS)	0,36 <sup>a</sup>	0,34 <sup>a</sup>	0,37 <sup>a</sup>	0,35 <sup>a</sup>	0,42 <sup>a</sup>	0,37	14,24
Ácido propiônico (%MS)	0,01 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,02	1,04

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste Tukey ( $P>0,05$ ).

<sup>1</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem.

<sup>2</sup>Concentração de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (NH<sub>3</sub>/NT).

Os valores de pH foram significativamente ( $P<0,05$ ) mais altos nas silagens controle e com  $5 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/g. KUNG et al. (2007) verificaram uma tendência de valores de pH mais baixos nas silagens inoculadas com  $4 \times 10^5$  (4,79),



$6 \times 10^5$  (4,83) e  $8 \times 10^5$  (4,81) UFC de *L. buchneri* g de grãos úmidos de milho inteiro comparado com a silagem controle (4,91).

As concentrações de  $\text{NH}_3/\text{NT}$  foram baixas e não diferiram significativamente entre as silagens. REIS et al. (2008) verificaram altas concentrações de  $\text{NH}_3/\text{NT}$  ( $P > 0,05$ ) nas silagens de grãos úmidos de milho controle e inoculadas com  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri* g, tendo como média 8,1% de  $\text{NH}_3/\text{NT}$ . TAYLOR & KUNG (2002) encontraram maiores concentrações de  $\text{NH}_3/\text{NT}$  ( $P < 0,05$ ) nas silagens de grãos úmidos de milho inoculadas com  $5 \times 10^5$  (0,048%),  $6,6 \times 10^5$  (0,048%) e  $1 \times 10^6$  (0,051%) UFC de *L. buchneri* g de grãos úmidos comparadas com a silagem controle (0,041%), ensiladas com 166 dias, entretanto essas concentrações foram consideradas muito baixas.

Os teores dos ácidos orgânicos não diferiram entre as silagens com o incremento das doses de *L. buchneri*. KUNG JR et al. (2007) verificaram que os teores de ácido láctico e propiônico não diferiram, porém o teor de ácido láctico foi numericamente inferior na silagem inoculada, e o teor de ácido acético aumentou quando inocularam  $6,6 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/g em silagem de grãos úmidos de milho moídos. Por outro lado, em silagens de grãos úmidos de milho inteiros, os autores verificaram que o teor de ácido láctico foi numericamente superior nas silagens inoculadas  $4 \times 10^5$  (0,16%),  $6 \times 10^5$  (0,18%) e  $8 \times 10^5$  (0,18%) UFC de *L. buchneri* g comparada com a silagem controle (0,14%) e os teores de ácido acético e propiônico aumentaram com o incremento das doses.

As bactérias do gênero *Lactobacillus* necessitam de uma alta quantidade de água metabólica para crescer e reproduzir, o que pode ser um fator limitante nas silagens de grãos úmidos de milho, interferindo nos produtos finais da fermentação (LANINGAN, 1963). Tal observação foi verificada na presente pesquisa, uma vez que não se encontrou diferença significativa nos produtos finais da fermentação entre as silagens inoculadas com *Lactobacillus buchneri* e a silagem controle. KUNG JR et al. (2007) atribuíram valores mais baixos de pH e teores mais altos de ácido láctico, encontrados nas silagens de grãos úmidos de milho inteiros tratadas com *L. buchneri* a restrita fermentação que ocorre nas silagens de grãos úmidos devido à ausência de umidade e a falta de carboidratos solúveis disponíveis nas silagens de grãos úmidos de milho inteiros.

Os valores de pH encontrados na presente pesquisa ficaram a baixo do limite (4,0 - 4,5) preconizado por KUNG JR & SHAVER (2001) para silagens de grãos úmidos de milho. Os teores de ácido láctico obtidos foram acima do limite (0,5 – 2,0%) proposto pelos referidos autores, enquanto os teores de ácido acético, propiônico e a concentração de  $\text{NH}_3/\text{NT}$  apresentaram-se dentro dos níveis preconizados, podendo ser consideradas silagens bem preservadas.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados referentes ao valor nutricional das silagens de grãos úmidos de milho em função dos tratamentos. Não se verificou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre as silagens nas variáveis estudadas que determinam o valor nutricional.

Os teores de PB encontrados na presente pesquisa foram semelhantes aos relatados por KUNG JR et al (2007), que também não verificaram diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre as silagens quando inocularam  $6,6 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/ g em silagem de grãos úmidos de milho.

Os teores de EE obtidos estão dentro do limite para silagens de grãos úmidos encontrados por VALADARES FILHO et al. (2006) que foi de  $3,98 \pm 1,20$ .

Os teores de FDN e FDA foram menores aos encontrados por KUNG et al (2007) que também não verificaram diferença significativa entre os componentes da fração fibrosa. Os referidos autores observaram teores de 8,36 e 8,29%MS de FDN nas silagens de grãos úmidos de milho controle e inoculada com  $6,6 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/g, respectivamente e teores de 2,32%MS de FDA nas duas silagens.

O coeficiente médio de DIVMO (88,60%) e o valor médio de NDT (87,61%) foram superiores ao encontrado por ÍTAVO (2004) que estudando silagem de grãos úmidos de milho, encontrou valores de 79,48% da DIVMO e 78,54% de NDT.

Esta inferioridade dos componentes fibrosos (FDN e FDA) e a superioridade da DIVMO e do NDT encontrada na presente pesquisa podem estar relacionada com a colheita antecipada dos grãos no campo. Uma vez que a formação da matriz protéica que encobre os grânulos de amido ainda não se finalizou (visualizada pelo ponto negro) e os grãos estão com um maior teor de umidade, a degradabilidade ruminal do amido é aumentada (PHILIPPEAU et al. 1996). Desta forma, durante o armazenamento, em função da fermentação adequada, pela produção de ácido láctico e preservação dos

açúcares que serviram como substrato para as bactérias ruminais, resultou assim, em um alimento de excelente qualidade, evidenciado pelos elevados coeficientes de digestibilidade e nutrientes digestíveis totais.

Tabela 3. Valor nutritivo das silagens de grãos úmidos de milho em função dos tratamentos.

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>					Média	CV (%) <sup>2</sup>
	SLB	LB1	LB2	LB3	LB4		
PB (%MS) <sup>3</sup>	10,96 <sup>a</sup>	10,70 <sup>a</sup>	10,17 <sup>a</sup>	10,29 <sup>a</sup>	10,69 <sup>a</sup>	10,56	4,06
EE (%MS)	3,98 <sup>a</sup>	4,05 <sup>a</sup>	4,20 <sup>a</sup>	4,69 <sup>a</sup>	4,10 <sup>a</sup>	4,20	19,38
FDN (%MS)	5,53 <sup>a</sup>	5,97 <sup>a</sup>	8,79 <sup>a</sup>	6,24 <sup>a</sup>	6,40 <sup>a</sup>	5,99	14,28
FDA (%MS)	1,19 <sup>a</sup>	1,04 <sup>a</sup>	1,34 <sup>a</sup>	1,64 <sup>a</sup>	1,43 <sup>a</sup>	1,33	19,21
DIVMO (%)	88,74 <sup>a</sup>	86,92 <sup>a</sup>	87,71 <sup>a</sup>	89,47 <sup>a</sup>	90,19 <sup>a</sup>	88,60	4,10
NDT (%)	87,69 <sup>a</sup>	85,85 <sup>a</sup>	86,68 <sup>a</sup>	88,61 <sup>a</sup>	89,25 <sup>a</sup>	87,61	4,15

\*Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

<sup>1</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g de forragem.

<sup>2</sup>CV: coeficiente de variação

<sup>3</sup>Matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), digestibilidade da matéria orgânica (DIVMO) e nutrientes digestíveis totais (NDT)

### 3.4. ESTABILIDADE AERÓBIA

Os valores de pH e os teores dos ácidos orgânicos das silagens de grãos úmidos de milho em função dos tratamentos e dos dias de exposição aeróbia estão apresentados na Tabela 4.

Não se verificou interação significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos e os dias de exposição aeróbia. Entretanto, os valores de pH das silagens inoculadas com *L. buchneri* foram numericamente inferiores ao da silagem controle até o 12º dia de exposição aeróbia (Tabela 4). Tais resultados corroboram aos obtidos por REIS et al. (2008) quando utilizaram  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/g de silagem de grãos úmidos de milho, avaliadas até o 15º dia de exposição aeróbia. Analisando somente os efeitos principais, as silagens inoculadas com  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g, apresentaram menores valores de pH ( $P < 0,05$ ) e no decorrer dos dias de exposição ao ar os valores de pH aumentaram significativamente ( $P < 0,05$ ).

Nos teores dos ácidos orgânicos (lático, acético e propiônico) não se verificaram interações significativas ( $P > 0,05$ ) entre as silagens e os dias de exposição aeróbia (Tabela 4). Entretanto, os teores de ácido lático das silagens inoculadas com  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g apresentaram superioridade numérica comparada as

demais no oitavo dia de exposição aeróbia. Com relação aos efeitos principais não se verificou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre as silagens, contudo ao passar dos dias de exposição aeróbia os teores dos ácidos orgânicos diminuiram significativamente ( $P<0,05$ ) devido ao consumo do ácido láctico pelas leveduras e volatilização dos ácidos acético e propiônico.

Tabela 4. Valores de pH e teores de ácidos orgânicos das silagens de grãos úmidos de milho, expressos em porcentagem da MS, em função dos tratamentos e dos dias de exposição aeróbia.

Tempo (dias)	Tratamentos <sup>1</sup>					Médias
	SLB	LB1	LB2	LB3	LB4	
pH						
0	3,98	3,98	3,90	3,90	3,90	3,93 <sup>C</sup>
4	4,31	4,10	4,00	3,90	3,90	4,04 <sup>C</sup>
8	6,11	5,84	5,83	4,93	4,83	5,51 <sup>B</sup>
12	7,41	7,14	7,20	6,70	7,30	7,15 <sup>A</sup>
Médias	5,45 <sup>a</sup>	5,27 <sup>ab</sup>	5,23 <sup>ab</sup>	4,86 <sup>b</sup>	4,98 <sup>b</sup>	
CV <sup>2</sup> (%)						5,48
Ácido láctico (% MS)						
0	3,90	3,70	3,84	3,16	3,61	3,64 <sup>A</sup>
4	3,40	3,18	3,42	3,64	2,95	3,32 <sup>A</sup>
8	1,93	1,76	1,78	2,20	2,07	1,95 <sup>B</sup>
12	1,07	0,94	0,93	0,92	0,79	0,93 <sup>C</sup>
Médias	2,58 <sup>a</sup>	2,40 <sup>a</sup>	2,50 <sup>a</sup>	2,50 <sup>a</sup>	2,36 <sup>a</sup>	
CV(%)						16,84
Ácido acético (%MS)						
0	0,36	0,34	0,37	0,35	0,42	0,37 <sup>A</sup>
4	0,28	0,29	0,26	0,29	0,30	0,28 <sup>B</sup>
8	0,17	0,21	0,16	0,17	0,16	0,17 <sup>C</sup>
12	0,16	0,15	0,17	0,17	0,16	0,16 <sup>C</sup>
Médias	0,24 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	
CV(%)						11,47
Ácido propiônico (%MS)						
0	0,01	0,02	0,01	0,02	0,03	0,02 <sup>A</sup>
4	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01 <sup>A</sup>
8	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00 <sup>B</sup>
12	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00 <sup>B</sup>
Médias	0,00 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	
CV(%)						0,61

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem pelo Teste Tukey ( $P>0,05$ ).

<sup>1</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem.

<sup>2</sup>CV: coeficiente de variação.

Na Tabela 5 está apresentada a composição microbiológica das silagens de grãos úmidos de milho em função dos tratamentos e dos dias de exposição. Verificou-se interação significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e os dias de exposição ao ar nas contagens de leveduras. A contagem de leveduras foi menor nas silagens inoculadas com *L. buchneri* até o 12º dia de exposição aeróbia, entretanto somente nas silagens inoculadas com as doses mais altas ( $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g) observou-se diferença significativa ( $P < 0,05$ ) comparada as demais no quarto dia de exposição aeróbia. Contudo estes dois tratamentos, LB3 e LB4, apresentaram menores contagens até o oitavo dia de exposição aeróbia, principalmente a silagem inoculada com  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g. TAYLOR & KUNG JR (2002) não verificaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nas contagens das colônias de leveduras entre as silagens de grãos úmidos de milho inoculadas ( $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $6,6 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g) e a controle, aos 92 e 166 dias de ensilagem, entretanto os autores verificaram menor contagem numérica de leveduras nas silagens inoculadas. KUNG et al (2007) verificaram maior contagem numérica de leveduras quando aplicaram  $6,6 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/g de silagem de grãos úmidos de milho (5,38 log UFC/g) comparada com a silagem controle (4,52 log UFC/g).

Verificou-se interação significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e os dias de exposição ao ar nas contagens de fungos filamentosos (Tabela 5). Na abertura (dia 0) as silagens tratadas com  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g apresentaram menores contagens numérica de fungos filamentosos. No quarto dia de exposição aeróbia todas as silagens tratadas apresentaram menores contagens de fungos filamentosos, entretanto, somente o tratamento LB4 ( $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g) apresentou diferença ( $P < 0,05$ ) dos demais. TAYLOR & KUNG JR (2002) não verificaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nas contagens das colônias de fungos filamentosos entre as silagens de grãos úmidos de milho inoculadas e a controle, aos 166 dias de ensilagem, entretanto os autores encontraram valor menor que 2,00 log UFC de fungos filamentosos/g nas silagens inoculadas com  $5 \times 10^5$ ,  $6,6 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri*/g. KUNG JR et al (2007) verificaram maior contagem de fungos filamentosos quando aplicaram  $6,6 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/g de silagem de grãos úmidos de milho (5,47 log UFC/g) comparada com a silagem controle (5,09 log UFC/g).

Tabela 5. Composição microbiológica das silagens de grãos úmidos de milho em função dos tratamentos e dos dias de exposição.

Tempo (dias)	Tratamentos <sup>1</sup>					Média
	SLB	LB1	LB2	LB3	LB4	
	Leveduras (Log UFC g <sup>-1</sup> )					
0	4,80 <sup>Aa</sup>	4,38 <sup>Aa</sup>	2,33 <sup>Aa</sup>	2,06 <sup>Ba</sup>	1,34 <sup>Ba</sup>	2,98
4	7,35 <sup>Aa</sup>	5,96 <sup>Aa</sup>	5,16 <sup>Aa</sup>	3,06 <sup>Bb</sup>	2,00 <sup>Bb</sup>	4,71
8	7,04 <sup>Aa</sup>	5,30 <sup>Aa</sup>	5,64 <sup>Aa</sup>	5,00 <sup>Ba</sup>	3,67 <sup>Ba</sup>	5,33
12	7,28 <sup>Aa</sup>	6,58 <sup>Aa</sup>	5,67 <sup>Aa</sup>	6,37 <sup>Aa</sup>	5,65 <sup>Aa</sup>	6,31
Média	6,62	5,55	4,70	4,12	3,16	
CV <sup>2</sup>						27,07
	Fungos filamentosos (Log UFC g <sup>-1</sup> )					
0	3,68 <sup>Aa</sup>	3,82 <sup>Aa</sup>	1,71 <sup>Ba</sup>	2,15 <sup>Ba</sup>	1,90 <sup>Ba</sup>	2,65
4	7,19 <sup>Aa</sup>	5,36 <sup>Aa</sup>	5,33 <sup>Aa</sup>	5,03 <sup>ABa</sup>	2,84 <sup>Bb</sup>	5,15
8	6,04 <sup>Aa</sup>	6,55 <sup>Aa</sup>	6,26 <sup>Aa</sup>	6,04 <sup>Aa</sup>	6,30 <sup>Aa</sup>	6,24
12	6,46 <sup>Aa</sup>	6,08 <sup>Aa</sup>	6,40 <sup>Aa</sup>	6,35 <sup>Aa</sup>	6,15 <sup>Aa</sup>	6,29
Média	5,84	5,45	4,93	4,89	4,30	
CV						18,85

\*Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem pelo Teste Tukey (P>0,05).

<sup>1</sup>Tratamentos: SLB - controle; LB1 - 5x10<sup>4</sup>, LB2 - 1x10<sup>5</sup>, LB3 - 5x10<sup>5</sup>, LB4 - 1x10<sup>6</sup> UFC de *L. buchneri*/g de forragem.

<sup>2</sup>CV: coeficiente de variação.

A deterioração aeróbia está associada com diminuição dos carboidratos solúveis e ácido láctico; aumento do pH, do número de leveduras e fungos filamentosos (WEINBERG et al., 1993) e da temperatura (PAHLOW et al. 2003). Tipicamente, um ou dois picos de temperatura são encontrados por causa da atividade dos fungos (HARA et al. 1979).

A variação da temperatura ambiente, da silagem controle e das silagens tratadas em função das horas de exposição aeróbia está apresentada na Figura 3. As temperaturas das silagens de grãos úmidos de milho comportaram-se de forma semelhante em todos os tratamentos, tendo seus picos de temperatura iniciados às 108 horas, exceto os tratamentos SLB e LB1 que tiveram os picos de temperaturas iniciados as 60 e 84 horas, respectivamente. As silagens inoculadas com doses a partir de 1x10<sup>5</sup> UFC de *L. buchneri*/g apresentaram temperaturas inferiores à da silagem controle até as 132 horas de exposição aeróbia.

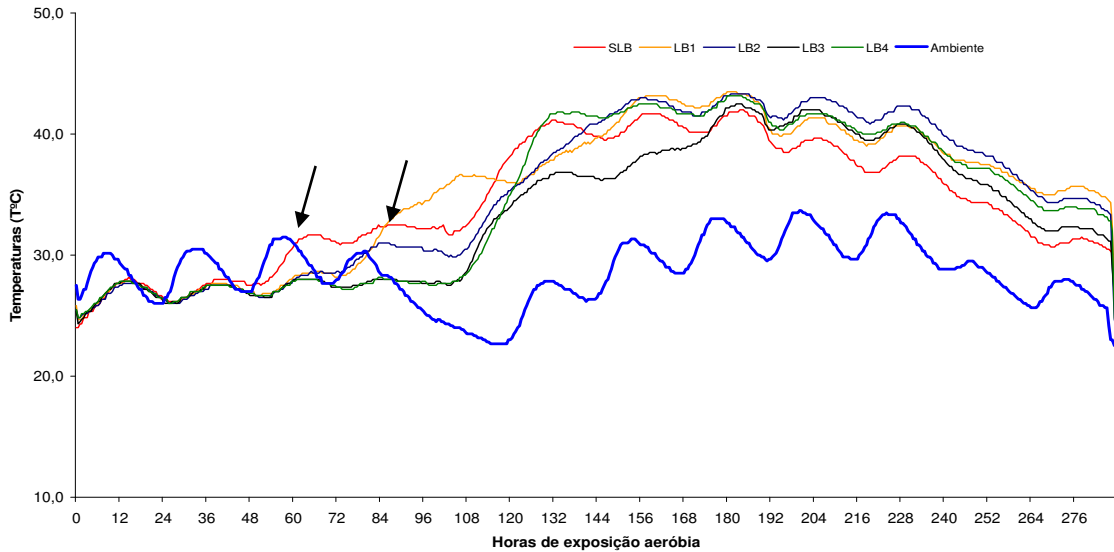


Figura 3. Temperatura ambiente e das silagens de grãos úmidos de milho submetidas às doses de *L. buchneri* em função das horas de exposição aeróbia.

<sup>1</sup>SLB - controle; LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g de forragem.

Segundo KUNG JR et al. (2003) a quebra da estabilidade aeróbia é definida como o número de horas que a temperatura da silagem exposta ao ar demora a atingir 2°C acima da temperatura do ambiente. O efeito das doses de *L. buchneri* sobre a quebra da estabilidade aeróbia das silagens de grãos úmidos de milho está apresentado na Figura 4.

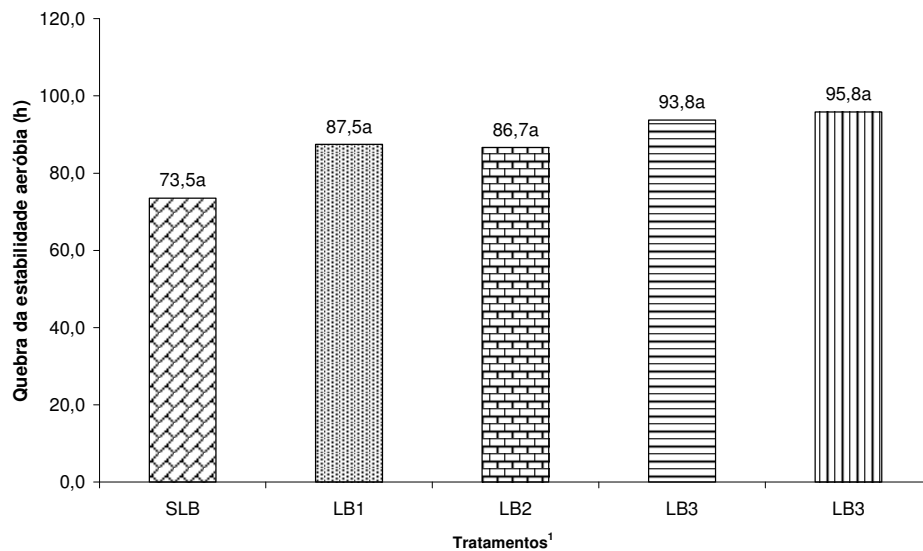


Figura 4. Efeito de doses de *L. buchneri* sobre a estabilidade aeróbia da silagem de grãos úmidos de milho.

SLB – controle, LB1 -  $5 \times 10^4$ , LB2 -  $1 \times 10^5$ , LB3 -  $5 \times 10^5$ , LB4 -  $1 \times 10^6$  UFC/g de material ensilado.

Observa-se que a aplicação de *L. buchneri*, independente da dose, melhorou numericamente a estabilidade aeróbia da silagem de grãos úmidos de milho, ocorrendo à quebra da estabilidade a partir de 86,7 horas (LB2), ou seja, 13,2 horas acima da silagem controle (CV= 13,51%). Os tratamentos LB3 ( $5 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri* /g) e LB4 ( $1 \times 10^6$  UFC de *L. buchneri* /g) permaneceram estáveis por maior tempo (Figura 4). TAYLOR & KUNG (2002) verificaram a melhora ( $P < 0,05$ ) na estabilidade aeróbia de silagens de grãos úmidos de milho quando utilizaram  $1 \times 10^5$  (208 h),  $5 \times 10^5$  (450 h),  $6,6 \times 10^5$  (450 h) e  $1 \times 10^6$  (450 h) UFC de *L. buchneri*/g comparado às 84 horas de estabilidade aeróbia da silagem controle. Os referidos autores sugerem que doses acima de  $5 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri* devem ser utilizadas em silagens de grãos úmidos para que haja melhora na estabilidade aeróbia. KUNG JR et al (2007) verificaram melhora de 200 horas na estabilidade aeróbia de silagens de grãos úmidos de milho quando aplicaram  $6,6 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/g. Os autores supracitados verificaram maior contagem numérica de leveduras e fungos filamentosos nas silagens tratadas após 90 dias de ensilagem, contudo obtiveram melhora na estabilidade aeróbia desta silagem, sugerindo que esta melhora foi devido ao maior teor de ácido acético nestas silagens, o que pode ter retardado o crescimento das leveduras durante a exposição aeróbia.

Analisando as Tabelas 4 e 5, e a Figura 4, verifica-se que nas silagens onde os números de leveduras foram menores (a partir de  $5 \times 10^5$  UFC de *L. buchneri*/g – LB3 e LB4), os teores de ácido láctico foram maiores e os valores de pH menores, enquanto a estabilidade aeróbia foi sutilmente melhorada, evidenciando que, onde foram aplicadas as maiores doses do inoculante houve efeito no controle dos microrganismos, entretanto os teores dos ácidos acético e propiônico, agentes antifúngicos (MOON, 1983), não se diferenciaram entre os tratamentos. Uma possível explicação para este fato, de acordo com DRIEHUIS et al. (1996) e MANN & SPOELSTRA (1997), é que o microrganismo *L. buchneri* pode produzir, além de bacteriocinas como a buchnericin LB (YILDIRIM & YILDIRIM, 2001), outros compostos com atividade antifúngicas e metabólicas ainda não conhecidos.



#### 4. CONCLUSÕES

A inoculação de *L. buchneri* controla o crescimento de leveduras e fungos filamentosos em silagem de grãos úmidos de milho, melhorando a estabilidade aeróbia da silagem, principalmente com a utilização de doses acima de  $5 \times 10^5$  UFC/g em condições de laboratório. O valor nutricional da silagem não foi afetado pela adição do inoculante.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BUCHANAN-SMITH, J.; MORRIS, J.R.; SMITH, T.K. High moisture grain and grain by-products. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.) **Silage Science and Technology**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2003, p.825-854.
- COMBS, D.K; HOFFMAN, P.C. Lactobacillus Buchneri of the aerobic stability in the silage. Focus on Forage. **University of Wisconsin Board of Regents**, v.3, n.14, 2001.
- DRIEHUIS, F.; SPOLESTRA, S.F.; COLE, S.C.J.; MORGAN, R. Improving aerobic stability by inoculation with Lactobacillus buchneri. In: The International Silage Conference, 11th, 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth, 1996, p.106-107.
- HARA, S.; ITOH, M.; OHYAMA, Y. Aerobic deterioration of silages and changes in temperature, gás metabolism, heat production and micro-flora. **Japanese Journal of Zootechnical Science**, v. 59, p. 549-556, 1979.
- HIGGINBOTHAM, G.E.; MUELLER, S.C.; BOLSEN, K.K.; DePETERS, E.J. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2185-2192, 1998.
- ÍTAVO, C.C.B.F. **Silagens de grãos úmidos de milho e de sorgo: padrão de fermentação, composição química, valor nutricional e crescimento em ovinos**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 79 p., 2004.

JOBIM, C.C.; BRANCO, A.F.; SANTOS, G.T. Silagem de grãos úmidos na alimentação de bovinos leiteiros. *In: V Simpósio goiano sobre manejo e nutrição de bovinos de corte e leite*, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2003, p. 357-376.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, R.A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36 (suplemento), p. 101-120, 2007.

LANIGAN, G. W. Silage bacteriology. I. Water activity and temperature relationships of silage strains of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, and *Pediococcus cerevisiae*. **Australian Journal of Biology Science**, v. 16, n.3, p. 606–615, 1963.

KUNG JR, L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W. HUBER, J.T. Added ammonia or microbial inoculant for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, v.67, n. 2, p.299-306, 1984.

KUNG JR., L.; SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. Focus on Forage. **University of Wisconsin Board of Regents**, v.3, n.13, 2001.

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

KUNG JR., L.; SCHMIDT, R. J.; EBLING, T. E.; Hu, W. The effect of lactobacillus buchneri 40788 on the fermentation and aerobic stability of ground and whole high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 5, p.2309-2314, 2007.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN; E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU M. K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n.4, p. 321-330, 1999.

MARI, L.J. **Intervalos entre cortes em capim-marandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A.Rich.) Stapf cv. Marandu): produção, valor nutritivo e perdas associadas à fermentação da silagem**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e

Pastagens). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 159p., 2003.

MANN, S.P. and SPOELSTRA, S.F. **Microorganisms and their use in treating animal feed and silage**. International Patent Specification no. PCT/GB97/00413. 1997.

McDONALD, P.; HENDERSON, A .R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340 p.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, n.6, p.1212-1240, 2002.

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

MUCK, R. E. **A lactic acid bacteria strain to improve aerobic stability of silages**. In U.S. Dairy Forage Research Center. Madison, WI. p. 46-47, 1996.

MUCK, R.E., PITT,R., E., LEIBENSPERGER, R.Y. A model of aerobic fungal growth in silage.1. Microbial characteristics. **Grass and Forage Science**, v. 46, n. 3, p. 283-290, 1991.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requeriments of dairy cattle**. 7. ed. Washinton, D.C.: 2001. 381p.

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

PARKER, R.B. **Methodology for determing quality of silage**. National Feed Ingredients Association, 1979. 33p.

PHILIPPEAU, C., CHAMPION, M., MICHALET-DOREAU, B. Influence du genotype et du stade de maturite sur la digestion ruminale de l'amidon de mais recolte au stade ensilage. *In*: Symposium on Silage maize, 1996, Nantes. **Anais...** Nantes,1996. p.379-380.

REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ALMEIDA, E.O.; JANUSCKIEWICZ, E.R.; BERNARDES, T.F.; ROTH, A.P.T.P. Efeito de doses de *Lactobacillus buchneri* “cepa ncimb 40788” sobre as perdas nos períodos de fermentação e pós-abertura da silagem de grãos úmidos de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 923-934, 2008.

SILVA, D.J., QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos (Métodos Químicos e Biológicos)**. UFV, Imprensa Universitária, 2002. 235p.

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

VALADARES FILHO, S.C.; MAGALHÃES, K.A.; ROCHA JUNIOR, V.R.; CAPELLE, E.R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 329p.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. Analysis of forages and fibrous foods. Cornell University, 1985. 202p.

VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminantes**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 98p, 1980.

WEINBERG, Z. G.; ASHBELL, G.; HEN, Y. et al. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 512-518, 1993.

WILSON, R.K. A rapid accurate method for measuring volatile fatty acids and lactic acid in silage. Ruakura: **Animal Research Institute**, 1971. p.1-12 (Research Report).

YILDIRIM, Z.; YILDIRIM, M. Characterization of buchnericin LB, produced by *Lactobacillus buchneri* LB. **Turkey Journal Biology**, v.25, p.73-82, 2001.

## **CAPÍTULO 4 – PERDAS NA ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGEM DE MILHO COBERTA COM FILME DE BAIXA PERMEABILIDADE AO OXIGÊNIO.**

**RESUMO** – Silagens armazenadas em silos horizontais são propensas à deterioração aeróbia, devido a grande área de superfície exposta ao ar. O filme de polietileno é o mais utilizado na vedação desses silos, entretanto, apresenta elevada permeabilidade ao oxigênio. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito do filme plástico de baixa permeabilidade associado ao filme convencional na vedação de silo tipo superfície. Foram confeccionados dois silos tipo superfície com plantas de milho. Estes silos foram cobertos parcialmente com filme de baixa permeabilidade (FBP) ao oxigênio associado ao filme convencional (FC) e com filme convencional (FC). Para avaliar as perdas fermentativas, a dinâmica microbiológica e a composição bromatológica foram colocados 6 sacos traçadores na zona periférica, em cada metade do silo. Foram avaliados os perfis de temperatura dos painéis dos silos. A composição bromatológica da silagem não foi afetada pelos filmes plásticos. Uma menor população de fungos foi encontrada na silagem coberta com o FBP associado ao FC, resultando em maior concentração de ácido láctico e menor pH, bem como menor temperatura da massa de silagem, menor perda de MS e de material deteriorado. O filme de baixa permeabilidade ao oxigênio associado ao filme convencional é eficiente na manutenção das características fermentativas, no controle da população de leveduras e na redução de perdas, mais evidente no silo com menor fatia de retirada.

Palavras chaves: Composição química, fungos, leveduras, perdas, polietileno

## 1. INTRODUÇÃO

Em condições brasileiras, as silagens são armazenadas, principalmente em silos horizontais. Nestes silos, há alta propensão à deterioração aeróbia na fase de armazenamento e utilização, devido a grande área de superfície exposta ao ar.

Há que se considerar que o processo de deterioração aeróbia é essencialmente microbiano e o crescimento dos microrganismos é condicionado por condições físicas e químicas das silagens (PAHLOW et al., 2003), portanto, um dos pré-requisitos essenciais é minimizar a presença de oxigênio no silo, após seu fechamento. Desse modo, o filme plástico assume um papel importante durante a etapa de vedação e a sua principal função é manter a anaerobiose (HONIG, 1991).

Os efeitos danosos do ar na qualidade da silagem são manifestados por dois caminhos (SAVOIE & JOFRIET, 2003). O primeiro ocorre na camada superficial durante o armazenamento pela penetração de oxigênio através do filme plástico de cobertura. O segundo efeito danoso do ar está relacionado à estabilidade aeróbia durante o período de remoção e fornecimento da silagem, usualmente manifestado pelo aparecimento de fungos, alterações no valor nutricional e aquecimento da massa.

No silo, as zonas mais porosas estão localizadas nas camadas superficiais e laterais, devido principalmente a dificuldade de compactação durante o enchimento. Quanto mais a massa é porosa, mais facilmente o ar poderá penetrar no seu interior, portanto, a redução da porosidade é a prerrogativa principal para conter a deterioração aeróbia (BERNARDES et.al, 2009).

Segundo KUZIN & SAVOIE (2001) as perdas nas áreas periféricas do silo são influenciadas pela espessura do filme plástico que deve ser proporcional ao tempo de estocagem da silagem. De acordo com SAVOIE (1988), as espessuras do filme de polietileno indicadas para confecção de silos de superfície são de 100, 150 e 200  $\mu\text{m}$  e devem ser usadas por 3, 7 e 12 meses, respectivamente.

Além da espessura do filme plástico, a permeabilidade ao oxigênio pode ser alterada pela sua coloração e pela temperatura ambiental. As flutuações da temperatura durante os dias determinam diferenças de pressão entre o gás no interior do silo e aquele da atmosfera circundante (TABACCO & BORREANI, 2002), e tais diferenças causam fluxo de gás, do exterior para o interior e vice-versa. Assim, quanto

maior for a permeabilidade do filme plástico, maior será o fluxo de gás (SAVOIE, 1988; TABACCO & BORREANI, 2002).

O material mais comum utilizado na vedação dos silos horizontais é o filme de polietileno (BORREANI et al., 2007), pelas suas características de mecânicas e de baixo custo (BORREANI & TABACCO, 2008), contudo, o polietileno apresenta elevada permeabilidade ao oxigênio (SNELL et al., 2002).

Entre as moléculas plásticas utilizáveis, a poliamida é um polímero que tem menor permeabilidade ao oxigênio, cerca de 90 vezes inferior à do polietileno. Segundo a American Society for Testing and Materials Standards (ASTM D3985-81) a permeabilidade do polietileno ao O<sub>2</sub> à temperatura de 23 °C e umidade relativa de 85% é de 178.000 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/24h/bar/μm de espessura, enquanto a poliamida apresenta 2000 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/24h/bar/μm de espessura. Este valores aumentam notavelmente quando a temperatura é elevada a 50 °C (534.000 e 10.000, respectivamente). Isto significa que durante o verão os riscos de deterioração aeróbia de silagens se elevam, principalmente nos países de clima tropical, pelo aumento da permeabilidade dos filmes plásticos (BERNARDES et.al, 2009).

DEGANO (1999) na 12<sup>a</sup> Conferencia Internacional sobre Silagem sugeriu uma nova estratégia de vedação, envolvendo a utilização de um filme de baixa permeabilidade ao oxigênio como alternativa ao filme padrão de polietileno. Este filme de baixa permeabilidade possui uma camada de poliamida entre duas camadas de polietileno (WILKINSON & RIMINI, 2002).

Existem dois tipos de filme de baixa permeabilidade, um preto e branco com 125μm de espessura e outro translúcido com 45μm de espessura que é utilizado na Europa e Estados Unidos em combinação com um sombrite. Entretanto, no Brasil têm sido conduzidos estudos com este filme de 45μm de espessura associado com o filme convencional de polietileno (BERNARDES et al., 2009).

Desta forma no presente estudo, objetivou-se avaliar o efeito do filme plástico de baixa permeabilidade ao oxigênio associado ao filme convencional nas características fermentativas, dinâmica microbiológica, composição bromatológica e perdas de silagem milho em silo tipo superfície.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no setor de Forragicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal - SP, localizada a 21°15'22" de latitude sul, 48°18'58" de longitude oeste e 595 metros de altitude, onde o clima na região é subtropical do tipo CWA de acordo com a classificação de Köppen. A temperatura média anual é de 22,3°C e mínima de 15,2°C no mês mais frio.

O híbrido de milho utilizado foi o Maximus (Syngenta), semeado em 13 de novembro de 2007 em Latossolo Vermelho eutroférico. Para adubação de semeadura foi utilizado 300 kg ha<sup>-1</sup> da fórmula 8-20-20 (N, P, K) e para a adubação de cobertura utilizou-se 400 kg ha<sup>-1</sup> da fórmula 20-0-20 (N, P, K).

A forragem foi colhida em 26 de fevereiro de 2008, quando os grãos apresentaram de um a dois terços da linha do leite (aproximadamente 32% de MS). Utilizou uma máquina colhedora forrageira Menta regulada para altura de corte de 20 cm e tamanho de partícula de 5 mm.

Foram confeccionados dois silos tipo superfície (capacidade de aproximadamente 75 t) contendo plantas de milho. Para verificar a eficiência do FBP associado ao FC na vedação, os silos foram divididos em duas partes longitudinais, ou seja, metade foi coberto com o FBP associado ao FC e a outra parte somente com FC.

O FC utilizado foi o filme de polietileno padrão branco e preto com 200 µm de espessura, enquanto que o FBP foi o filme translúcido com duas camadas de polietileno e uma camada central de poliamida com 45 µm de espessura. As dimensões dos silos experimentais estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Dimensões dos silos tipo superfície.

Silos	Dimensões			
	Base maior	Base menor	Altura	Comprimento
1	5,8	3,4	1,25	21,5
2	5,8	3,8	1,38	18,5



Para avaliar as perdas fermentativas, foram enterrados 6 sacos traçadores (sacos de náilon, conhecidos como sacos de rafia) na zona periférica a 15 cm da superfície, em cada metade dos silos, totalizando 12 sacos por silo (Figura 1). Esta disposição dos sacos no silo foi necessária, pois amostras de silagem devem ser retiradas simultaneamente durante a remoção, devido à elevada influência dos parâmetros climáticos sobre o fenômeno estudado. A utilização de sacos distribuídos no interior dos silos como método de estudo da fermentação em silagens foi discutido por McDONALD et al. (1991).

Foram realizadas amostragens para determinação da composição químico-bromatológica e microbiológica referente à pré-ensilagem, e posteriormente os sacos traçadores contendo, em média 3,5 kg de forragem picada foram distribuídos nos silos.

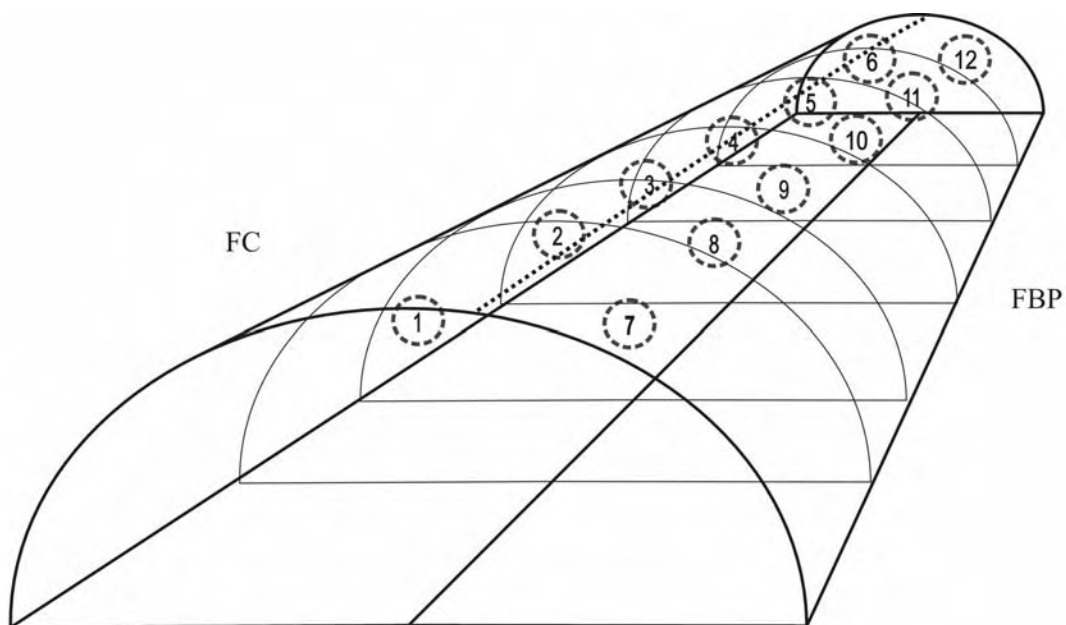


Figura 1. Localização dos sacos traçadores no silo tipo superfície.

Em 07 de maio de 2008, decorridos 70 dias de fermentação, o primeiro silo (Silo 1) foi aberto e os sacos retirados conforme a remoção da silagem. Os sacos foram pesados, depois de retirado o excesso de silagem aderida ao saco; abertos, homogêneos e amostrados para determinação da composição química (pH,

nitrogênio amoniacal, ácidos orgânicos voláteis e ácido láctico), bromatológica e microbiológica (leveduras e fungos filamentosos).

As perdas foram calculadas a partir da seguinte equação:

$$\text{Perdas (\%)} = 100 - (\text{MSr/MSe}) * 100$$

MSr: matéria seca na retirada (quantidade de forragem (kg) x % matéria seca);

MSe: matéria seca ensilada (quantidade de forragem (kg) x % matéria seca).

Para determinação da composição químico-bromatológica as amostras foram colocadas em saco de papel, pesadas e levadas para estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 horas. Após esse período foram pesadas novamente, moídas em moinho de faca até o tamanho das partículas atingirem menos de 1 mm e armazenadas em potes de plástico. Os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e nitrogênio total (NT) foram determinados conforme método descrito por SILVA & QUEIROZ (2002), sendo a proteína bruta (PB) obtida pelo produto entre o nitrogênio total e o fator 6,25. Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidos de acordo com MERTENS (2002), sem o uso de sulfato de sódio e utilizando-se amilase termoestável. A fibra em detergente ácido (FDA) e a lignina (solubilização da celulose (CEL) em ácido sulfúrico 72%) foram obtidas pelo método sequencial de VAN SOEST & ROBERTSON (1985). A hemicelulose (HEM) foi calculada pela diferença entre FDN e FDA.

Em amostras frescas de silagem foi elaborado extrato aquoso segundo KUNG Jr. et al. (1984) para determinar os valores de pH com uso de um peagâmetro digital, a concentração de N amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) mediante a destilação com hidróxido de potássio 2N conforme técnica descrita por FENNER (1965) adaptada por VIEIRA (1980), os teores dos ácidos orgânicos voláteis por meio de cromatografia gasosa (WILSON, 1971) e o teore de ácido láctico por meio de espectrofotometria colorimétrica (SILVA & QUEIROZ, 2002).

Para avaliar a dinâmica microbiológica foram pesados 25 g de forragem fresca, adicionado 225 mL de solução peptonada 0,1% (0,1 g de peptona por litro de água destilada). Após agitação manual foi retirado 1 mL do extrato para as diluições (10<sup>-2</sup> a 10<sup>-6</sup>) em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril (8,5 g de NaCl/litro de água destilada). Foi semeado 0,1 mL das diluições em placas de Petri descartáveis

contendo o meio ágar batata acidificado (Difco) em duplicata (PARKER, 1979). As placas foram incubadas em aerobiose a 28°C por 48 e 96 horas, conforme HIGGINBOTHAM et al (1998), quando então foi procedida a contagem das colônias de leveduras e fungos, respectivamente. Os números de microrganismos foram contados como unidade formadora de colônias (UFC) e transformados em logaritmo na base 10.

No painel dos silos foram avaliados semanalmente, a fração deteriorada e o perfil de temperatura. Para mensurar a fração deteriorada, do material retirado no dia, foram pesados em ambos os lados (FC e FBP) o material não e o deteriorado, obtendo desta forma o percentual deteriorado de cada tratamento. Na avaliação do perfil de temperatura no painel dos silos, foram inseridos termômetros digital do tipo espeto a uma profundidade de 10 cm em 20 pontos no painel, sendo 10 pontos de cada lado conforme Figura 2.

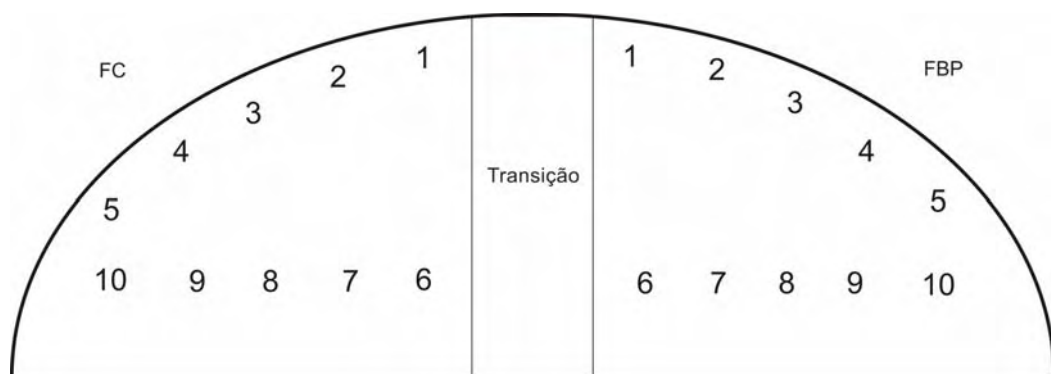


Figura 2. Pontos de medida de temperatura do painel do silo.

A silagem do primeiro silo (silo 1) foi consumida em 61 dias e a média de avanço diário foi de 30 cm. O segundo silo (silo 2) foi aberto no dia 7 de julho de 2008, decorridos 131 dias de fermentação, onde procedeu-se as mesmas avaliações mencionadas para o silo 1. A silagem do silo 2 foi consumida em 61 dias e a média de avanço diário foi de 22 cm.

As variáveis de cada silo foram analisadas separadamente. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 6 repetições. Os dados foram

submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização inicial das plantas de milho na pré-ensilagem está apresentada na Tabela 1. Os teores de MS e MM, expressos em percentagem, da planta de milho estão dentro do limite encontrado por VALADARES FILHO et al. (2006). Por outro lado, os componentes da fração fibrosa e o teor de PB apresentaram valores inferiores e superiores, respectivamente, aos encontrados pelos referidos autores. Tal fato pode estar relacionado à alta quantidade de grãos produzidos pelo híbrido Maximus.

Os valores de pH observados (Tabela 1) foram inferiores aos encontrados por FILYA et al. (2006) de 5,94, por FILYA (2003) de 5,86 e por DRIEHUIS et al. (1999) de 5,87 em planta de milho.

As contagens de leveduras e fungos filamentosos (Tabela 1) foram maiores às encontradas por FILYA et al. (2006) e por FILYA (2003).

Tabela 1. Caracterização inicial da planta de milho na pré-ensilagem.

Variáveis <sup>1</sup>	Planta de milho
MS (%)	29,73±0,88
MM (%)	4,19±0,12
PB (%)	12,27±0,24
FDN (%)	50,61±2,56
FDA (%)	21,18±1,03
HEM (%)	30,42±3,43
CEL (%)	17,88±0,77
LIG (%)	2,78±0,29
pH	4,86±0,25
Leveduras (Log UFC/g)	7,05±0,04
Fungos Filamentosos (Log UFC/g)	5,21±0,25

<sup>1</sup>Matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM), celulose (CEL) e lignina (LIG).

Os resultados da composição químico-bromatológica, da população de leveduras e fungos filamentosos e das perdas de MS das silagens de milho nos silos 1 e 2, estão apresentados na Tabela 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Características da silagem de milho coberta com dois tipos filmes plásticos (silo 1).

Variáveis <sup>2</sup>	Filme plástico <sup>1</sup>		CV (%) <sup>3</sup>
	FC	FBP	
MS (%)	30,91 <sup>a</sup>	30,24 <sup>a</sup>	6,67
MM (%)	3,79 <sup>a</sup>	3,82 <sup>a</sup>	7,51
PB (%)	9,14 <sup>a</sup>	9,00 <sup>a</sup>	4,35
FDN (%)	48,32 <sup>a</sup>	47,54 <sup>a</sup>	6,48
FDA (%)	33,36 <sup>a</sup>	32,74 <sup>a</sup>	8,67
HEM (%)	14,96 <sup>a</sup>	14,80 <sup>a</sup>	15,83
CEL (%)	22,06 <sup>a</sup>	19,14 <sup>a</sup>	13,98
LIG (%)	6,99 <sup>a</sup>	7,58 <sup>a</sup>	17,64
pH	4,38 <sup>a</sup>	4,42 <sup>a</sup>	10,46
NH <sub>3</sub> -N, % de N Total	5,02 <sup>a</sup>	5,17 <sup>a</sup>	25,14
Ácido lático (% da MS)	5,97 <sup>a</sup>	5,62 <sup>a</sup>	27,54
Ácido acético (% da MS)	1,17 <sup>a</sup>	0,95 <sup>a</sup>	9,71
Ácido propionico (% da MS)	0,06 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	3,06
Ácido butírico (% da MS)	0,007 <sup>a</sup>	0,007 <sup>a</sup>	35,67
Leveduras (log <sub>10</sub> ufc/g)	6,31 <sup>a</sup>	5,16 <sup>a</sup>	48,29
Fungos filamentosos (log <sub>10</sub> ufc/g)	4,92 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>	62,06
Perdas de MS (%)	6,47 <sup>a</sup>	3,23 <sup>b</sup>	23,77

\*Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste Tukey (P>0,05).

<sup>1</sup>Filme plástico: FC – Filme convencional; FBP – Filme de baixa permeabilidade de oxigênio.

<sup>2</sup>Matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM), celulose (CEL), lignina (LIG).

<sup>3</sup>CV: coeficiente de variação

Não foram verificadas diferenças significativas (P>0,05) na composição bromatológica das silagens cobertas com os diferentes filmes plásticos no silo 1 e no silo 2 (Tabela 2 e 3). Os teores de MS e MM apresentaram-se próximos à média nacional das silagens de milho (30,92 % MS e 4,79 % MM) (VALADARES FILHO et al., 2006). Os teores de PB (Tabela 2) foram superiores aos encontrados por PEREIRA et al. (2007) que avaliaram diferentes híbridos de milho (AG122, AG9090, AG5011, DOW766 e DKB747) e obtiveram média de 6,52%.

Os teores de FDN, HEM e CEL (Tabela 2) apresentaram-se abaixo do encontrado por VALADARES FILHO et al. (2006) que foram de 55,41, 23,71 e 24,94%, respectivamente. Entretanto, os teores de FDA e LIG foram superiores aos encontrados pelos referidos autores que verificaram 30,63% de FDA e 4,97% de LIG.

No silo 1 não se verificou diferença significativa ( $P>0,05$ ) nas silagens cobertas com os diferentes filmes plásticos nos valores de pH, nos teores de  $\text{NH}_3\text{-N}$  e de ácidos orgânicos e na população de leveduras e fungos filamentosos (Tabela 2).

Os valores de pH foram ligeiramente superiores ao preconizado por KUNG JR & SHAVER (2001) de 3,8 a 4,2 na silagem de milho. Contudo, os teores de  $\text{NH}_3\text{-N}$  e de ácidos orgânicos apresentaram-se próximo à faixa preconizada pelos referidos autores de 5 a 7 % de  $\text{NH}_3\text{-N}$  (% NT), de 4 a 7% de ácido láctico, de 1 a 3% de ácido acético, menor que 0,1% de ácido propionico e 0% de ácido butírico.

Em relação à população de microrganismos, verificou-se redução de 1,15 e 1,82  $\log_{10}$  UFC/g na população de leveduras e fungos filamentosos, respectivamente, na silagem coberta com FBP associada ao FC quando comparada à silagem coberta somente com o FC, entretanto esta diferença não foi significativa (Tabela 2). BORREANI et al., (2007) não verificaram diferenças significativas entre as silagens de milho cobertas com FBP e FC na população de leveduras, encontrando valores menores que 1 e de 1,66  $\log_{10}$  UFC/g, respectivamente. Entretanto, os mesmos autores, em outro estudo, verificaram 1,55  $\log_{10}$  UFC de fungos filamentosos /g na silagem coberta com o FBP, enquanto que na silagem coberta com o FC a população de fungos filamentosos foi de 5,07  $\log_{10}$  UFC/g ( $P<0,05$ ). MIYAZAKI (2008) verificou população de 1,99 e 3,13  $\log_{10}$  UFC de leveduras/g em silagem de milho coberta com FBP associado com FC e somente com FC, respectivamente. BERNARDES et al. (2009) verificaram menor contagem de fungos filamentosos na silagem de milho coberta com FBP (2,72  $\log_{10}$  UFC/g) em relação à silagem coberta com FC (4,06  $\log_{10}$  UFC/g), embora sem diferença significativa ( $P>0,05$ ).

A perda de MS foi significativamente diferente entre as silagens ( $P<0,05$ ). A silagem coberta com o FBP associado ao FC apresentou redução de 3,24 pontos percentuais de perda de MS, ou seja, 50% a menos de perdas quando comparada à silagem coberta somente com o FC ( $P<0,05$ ) (Tabela 2). MIYAZAKI (2008) verificou redução de 1,5 pontos percentuais de perda de MS de silagem de milho coberta com FBP associado ao FC comparada à silagem coberta somente com o FC. Em estudo conduzido na Itália BORREANI et al., (2007) não verificaram diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre as silagens cobertas com o FC e FBP, entretanto a silagem coberta com

FBP apresentou obteve redução de 3,05 pontos percentuais de perda de MS em relação ao FC. Em outro estudo, os mesmos autores verificaram redução de 27,17 pontos percentuais de perda de MS na silagem coberta com FBP, quando comparada a utilização do FC.

No silo 2 se verificou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as silagens cobertas com os diferentes filmes plásticos nos valores de pH, no teor de ácido láctico e propionico e na população de leveduras (Tabela 3).

Tabela 3. Características da silagem de milho coberta com dois tipos filmes (silo 2).

Variáveis	Filme plástico <sup>1</sup>		CV (%) <sup>3</sup>
	FC	FBP	
MS (%)	29,25 <sup>a</sup>	30,18 <sup>a</sup>	4,59
MM (%)	3,87 <sup>a</sup>	3,81 <sup>a</sup>	9,07
PB (%)	9,45 <sup>a</sup>	9,05 <sup>a</sup>	5,83
FDN (%)	45,28 <sup>a</sup>	45,43 <sup>a</sup>	7,26
FDA (%)	32,65 <sup>a</sup>	30,28 <sup>a</sup>	8,40
HEM (%)	12,63 <sup>a</sup>	15,15 <sup>a</sup>	13,63
CEL (%)	21,53 <sup>a</sup>	19,66 <sup>a</sup>	11,30
LIG (%)	6,37 <sup>a</sup>	6,54 <sup>a</sup>	6,46
pH	4,08 <sup>a</sup>	3,82 <sup>b</sup>	3,33
NH <sub>3</sub> -N, % de N Total	6,42 <sup>a</sup>	6,66 <sup>a</sup>	15,84
Ácido láctico (% da MS)	5,05 <sup>b</sup>	6,60 <sup>a</sup>	15,79
Ácido acético (% da MS)	1,98 <sup>a</sup>	1,70 <sup>a</sup>	31,87
Ácido propionico (% da MS)	0,32 <sup>a</sup>	0,09 <sup>b</sup>	7,61
Ácido butírico (% da MS)	0,008 <sup>a</sup>	0,005 <sup>a</sup>	43,65
Leveduras (log <sub>10</sub> ufc/g)	7,69 <sup>a</sup>	5,18 <sup>b</sup>	25,54
Fungos filamentosos (log <sub>10</sub> ufc/g)	3,99 <sup>a</sup>	3,97 <sup>a</sup>	63,23
Perdas de MS (%)	4,69 <sup>a</sup>	3,96 <sup>a</sup>	51,01

\*Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

<sup>1</sup>Filme plástico: FC – Filme convencional; FBP – Filme de baixa permeabilidade de oxigênio.

<sup>2</sup>Matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM), celulose (CEL), lignina (LIG).

<sup>3</sup>CV: coeficiente de variação

O valor de pH da silagem coberta com o FC foi superior ao da silagem coberta com o FBP ( $P < 0,05$ ) (Tabela 3). BORREANI et al. (2007) verificaram que o pH da silagem de milho foi significativamente superior na silagem coberta com o FC (5,89) comparado ao FBP (3,99). BERNARDES et al. (2009) observaram pH de 5,75 em

silagem de milho coberta com FC, enquanto que o pH da silagem coberta com FBP foi de 4,54, embora sem diferença significativa.

O teor de ácido láctico foi significativamente inferior na silagem coberta somente com o FC (5,05 %MS) comparado ao da silagem coberta com o FBP associado ao FC (6,6 %MS) (Tabela 3). BORREANI et al. (2007) verificaram em silagem de milho coberta com FC que o teor de ácido láctico foi de 2,05 %MS e o da silagem coberta com FBP foi de 0,87 %MS ( $P < 0,05$ ).

O teor de ácido propionico foi de 0,32%MS na silagem coberta somente com FC, enquanto que na silagem coberta com FBP associado ao FC o teor deste ácido foi de 0,09 %MS (Tabela 3). BORREANI et al. (2007) verificaram teor de ácido propionico de 0,68 %MS na silagem coberta com FC, enquanto que na silagem coberta com FBP o teor de ácido propionico foi de 0,35 %MS ( $P < 0,01$ ).

A população de leveduras foi significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) na silagem de milho coberta com FBP (5,18  $\log_{10}$  UFC/g) comparada à silagem coberta com o FC (7,69  $\log_{10}$  UFC/g). BERNARDES et al. (2009) verificaram que a população de leveduras foi de 4,72  $\log_{10}$  UFC/g na silagem de milho coberta com FBP e na silagem de milho coberta com FC a população de leveduras foi de 5,21  $\log_{10}$  UFC/g ( $P > 0,05$ ).

Com relação à perda por fração deteriorada, avaliadas no painel dos silos, verificou-se que na silagem coberta com o FC associado ao FC a perda de material deteriorado foi de 3%, enquanto que a perda na silagem coberta somente com o FBP foi de 1,5%. Ou seja, de 75 t de silagem que havia no silo, 1,125 t foram perdidas quando se utilizou somente o FC. Cumpre salientar que tais resultados foram verificados nos dois silos avaliados. Na Figura 3 pode ser visualizada a diferença de material deteriorado decorrente da utilização dos diferentes tipos de filmes.





Figura 3. Painel do silo contendo planta inteira de milho, coberto com filme convencional (FC) e filme de baixa permeabilidade ao oxigênio (FBP).

Nas figuras 4 e 5, estão apresentadas as médias das temperaturas do painel dos silos das regiões periférica e central (silo 1 e 2, respectivamente).

Nos dois silos avaliados a média da temperatura da região periférica foi superior na silagem coberta somente com o FC, embora sem diferença significativa ( $P > 0,05$ ; Silo 1 – CV = 9,13%; Silo 2 - CV = 16,70) (Figura 4 e 5). No silo 1, a temperatura da região periférica da silagem coberta somente com o FC variou de 24,0 a 40,5 °C, enquanto que na silagem coberta com o FBP associado ao FC a variação de temperatura foi de 25,5 a 45,5 °C. No silo 2, a variação da temperatura na região periférica da silagem coberta somente com o FC foi de 18,5 a 52,5 °C e na silagem coberta com o FBP associado ao FC a variação de temperatura foi de 17,5 a 47,5 °C.

A temperatura do painel na região central se manteve mais estável nos dois silos (Figura 4 e 5). No silo 1, tanto sob o FC como sob o FBP associado ao FC a temperatura da silagem na região central variou de 24 a 33 °C. No silo 2, a temperatura da silagem na região central variou de 22,5 a 40,5 °C na silagem coberta somente com o FC e de 22 a 33,5 °C na silagem coberta com o FBP associado ao FC. Neste caso pode ter ocorrido uma transferência de calor da região periférica à central, uma vez que os pontos de maior temperatura estão localizados próximos as laterais do silo tipo superfície (ponto 10, Figura 2).

BERNARDES (2006) encontrou temperaturas mais elevadas na silagem coberta somente com o FC (42-46°C), enquanto que a temperatura da silagem coberta com o FBP associado ao FC estava mais amena (30-34°C).

Segundo McDONALD et al. (1991) a elevação da temperatura na silagem é um indicador de deterioração aeróbia e da atividade de oxidação por parte das leveduras e fungos filamentosos. Os resultados apresentados na presente pesquisa concordam com a afirmação dos referidos autores, uma vez que ao se analisar as Tabelas 2 e 3, verifica-se maior população de leveduras e fungos filamentosos na silagem coberta somente com o FC e na Figura 4 e 5 maior temperatura na região periférica da silagem coberta somente com o FC.

Cabe salientar que a fatia de retirada do silo 2 foi de 22 cm, ou seja, a silagem permaneceu por maior tempo em contato com o oxigênio que penetra no painel do silo, comparado ao silo 1, cujo a fatia de retirada foi de 30cm. Ou seja, no silo 2, pode-se evidenciar melhor a diferença entre os filmes plásticos.

Pode-se inferir, portanto, que o FBP associado ao FC controlou a estabilidade aeróbia da silagem de milho em silo superfície, uma vez que uma menor população de fungos foi encontrada, resultando em maior concentração de ácido lático e menor pH, bem como menor perda de MS e de material deteriorado.

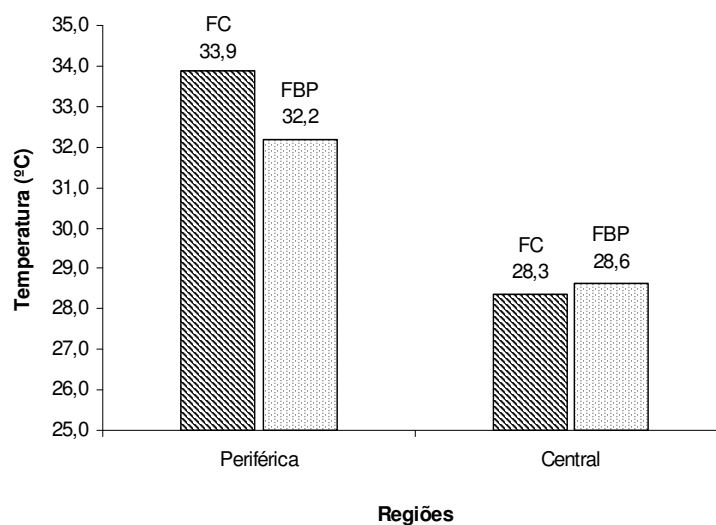


Figura 4. Média das temperaturas do painel do silo das regiões periférica e central (silo 1).

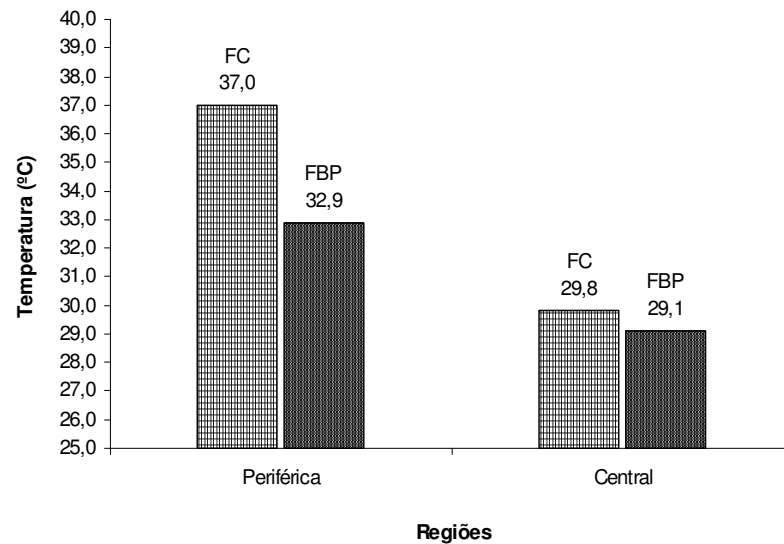


Figura 5. Média das temperaturas do painel do silo das regiões periférica e central (silo 2).

#### 4. CONCLUSÕES

O filme de baixa permeabilidade ao oxigênio associado ao filme convencional é eficiente na manutenção das características fermentativas, no controle da população de leveduras e na redução de perdas, principalmente quando a fatia de retirada é menor.

#### 5. REFÊRENCIAS

BERNARDES, T. F. **Controle da deterioração aeróbia de silagens**. 2006. 103f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BERNARDES, T.F.; AMARAL, R.C.; NUSSIO, L.G. Sealing strategies to control the top losses in horizontal silos. In: The International Symposium on Forage Quality and Conservation, 2009, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro, 2009, p. 190-209.

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

- BORREANI, G.; TABACCO, E. A new oxygen barrier stretch enhances quality alfalfa wrapped silage. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.10, p.4701-4706, 2008.
- DEGANO, L. Improvement of silage quality by innovative covering system. In: The International Silage Conference, 12th, 1999, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala, 1999, p. 296-297.
- DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, W.H., SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p. 583-594, 1999.
- FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Dairy Science**, v.86, n. 11, p.3575-3581, 2003.
- FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. **Journal of applied microbiology**, v.101, p. 1216-1223, 2006.
- HIGGINBOTHAM, G.E.; MUELLER, S.C.; BOLSEN, K.K.; DePETERS, E.J. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2185-2192, 1998.
- HONIG, H. Reducing losses during storage and unloading of silage. In: PAHLOW, G; HONIG, H (Eds). **Forage conservation towards 2000**. 1.ed. Braunschweig: European Grassland Federation, 1991. p.116-128.
- KUNG JR, L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W. HUBER, J.T. Added ammonia or microbial inoculant for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, v.67, n. 2, p.299-306, 1984.
- KUNG JR., L.; SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. Focus on Forage. **University of Wisconsin Board of Regents**, v.3, n.13, 2001.
- KUZIN, V.; SAVOIE, P. Modeling air infiltration in bunker silos to optimize the cover. In: **Annual International Meeting Sponsored**. Sacramento: ASAE. 2001, 10p.

McDONALD, P.; HENDERSON, A .R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340 p.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, n.6, p.1212-1240, 2002.

MIYASAKI, M. K. **Uso de aditivo microbiano e de filme plástico no controle da fermentação e da deterioração aeróbia de silagem de milho**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 92p., 2008.

PAHLOW, G; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. *In*: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-94.

PARKER, R.B. **Methodology for determining quality of silage**. National Feed Ingredients Association, 1979. 33p.

PEREIRA, E.S.; MIZUBUTI, I.Y.; PINHEIRO, S.M.; VILLARROEL, A.B.S.; CLEMENTINO, R.H. Avaliação da qualidade nutricional de silagens de milho (*Zea mays*, L). **Revista Caatinga**, v. 20, n.3, p. 8-12, 2007.

SAVOIE, P. Optimization of plastic covers for stack silos. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 41, p. 65-73, 1988.

SAVOIE, P.; JOFRIET, J.C. Silage Storage. *In*: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 405-468.

SILVA, D.J., QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos (Métodos Químicos e Biológicos)**. UFV, Imprensa Universitária, 2002. 235p.

SNELL, H.G.J; OBERNDORFER, C; LUCKE, W; et al. Effects of the colour and thickness of polyethylene film on ensiling conditions and silage quality of chopped

maize, as investigated under ambient conditions and mini-silos. **Grass and Forage Science**, v. 57, p. 342-350, 2002.

TABACCO, E.; BORREANI, G. Extent of aerobic deterioration in farm maize silage as affected by silo management. In: The International Silage Conference, 13<sup>th</sup>, 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive, 2002, p.178-179.

VALADARES FILHO, S.C.; MAGALHÃES, K.A.; ROCHA JUNIOR, V.R.; CAPELLE, E.R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 329p.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. Analysis of forages and fibrous foods. Cornell University, 1985. 202p.

VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminantes**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 98p, 1980.

WILKINSON, J.M.; RIMINI, R. Effect of triple co-extruded film (TCF) on losses during the ensilage of ryegrass. p. 168–169. In: The International Silage Conference, 13<sup>th</sup>, 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive, 2002, p.178-179.

WILSON, R.K. A rapid accurate method for measuring volatile fatty acids and lactic acid in silage. Ruakura: **Animal Research Institute**, 1971. p.1-12 (Research Report).