

HAROLDO SANTIAGO COUTINHO

**SILAGENS DE MILHO E SORGO TRATADAS COM INOCULANTE  
MICROBIANO À BASE DE BACTÉRIAS HOMO  
E HETEROLÁTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C871s  
2009

Coutinho, Haroldo Santiago, 1966-  
Silagens de milho e sorgo tratadas com inoculante  
microbiano à base de bactérias homo e heteroláticas /  
Haroldo Santiago Coutinho. – Viçosa, MG, 2009.  
xii, 22f. : il. ; 29cm.

Orientador: Odilon Gomes Pereira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 19-22

1. Milho - Silagem. 2. Sorgo - Silagem. 3. Silagem -  
Microbiologia. 4. Bactérias lácticas. 5. Enterobactérias.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.


CDD 22. ed. 633.15


HAROLDO SANTIAGO COUTINHO

**SILAGENS DE MILHO E SORGO TRATADAS COM INOCULANTE  
MICROBIANO À BASE DE BACTÉRIAS HOMO  
E HETEROLÁTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de dezembro de 2009.

  
Prof. José Maurício de Souza Campos

  
Prof. Sebastião de Campos V. Filho  
(Coorientador)

  
Prof. Odilon Gomes Pereira  
(Orientador)

*“Que é o homem para que dele te lembres e o filho do homem para que o visites? Fizeste-o, no entanto um pouco menor que o grande EU SOU, e honra de glória o coroaste. Deste-lhe domínio sobre as obras de tua Mão e sob seus pés, tudo lhe puseste ovelhas e bois todos e também os animais do campo.”*

Salmo, cap. 8, vers. 4-7.

*Ao meu pai, Arlindo Santiago, pelo exemplo e pela hombridade com que me ensinou a viver: “Melhor ser lesado que vitimar outrem”. Suas palavras numa conversa de calçada, numa tarde ensolarada de um dia de primavera, na pacata Lagoinha, Minas Gerais.*

*À minha preciosa mãe, pois sem o seu esforço eu jamais teria lido ou escrito qualquer destas palavras.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, eterno, imortal, invisível, mas real, criador e mantenedor do universo, pois sem a sua graça nada teria sentido ético, moral ou científico.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade do curso.

À minha esposa, Flávia Valéria, pelo amor a mim voluntariamente dispensado e pelo ardor com que tem cuidado de nossos três filhos: João Vítor, Ana Luíza e Samuel Arlindo.

Aos meus irmãos, Erlon, Lene, Marlete, Marluce e, em especial, Nilde, pelo estímulo inicial.

A todos os meus sobrinhos, Ju, Ro, Naiara, Natan, Júnior, Murilo, Marcelinha e Mardim, e aos meus cunhados, pela ajuda e pelo encorajamento.

Ao Décio Amorim e família.

Ao Augusto César Rodrigues, pela antiga e verdadeira amizade, e à sua querida Gui.

Ao Professor Odilon Gomes Pereira, pela oportunidade e pela confiança.

À Professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela amizade e pela preciosa ajuda no início desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Forragens do Departamento de Zootecnia, Andreia Cesário, João Paulo, Lilian, Penha e Wender, pela valiosa ajuda.

Ao Professor Sebastião de Campos Valadares Filho, pela organização do Mestrado Profissionalizante e pelas boas orientações.

Ao Professor José Maurício de Souza Campos.

Ao Professor José Antônio Obeid e à Lenira.

Aos colegas e amigos Elmo, Fernando, Sheila, Samuel, Maria, Daniel Navarro e Kerley, por compartilharem seu tempo e pela convivência ao longo do curso.

Aos “pais adotivos”, Sr. Roberto e D. Marlene, pela preciosa e rica ajuda, e ao Jorge, pelo incentivo e pela busca constante de oportunidades.

Aos amigos Fabinho e Jorge, pela ajuda preciosa no começo de tudo.

Ao pessoal do Laboratório Microbial, Elza, Maria Lúcia, Walquíria e Izabel, pela confiança.

Ao Sr. Iquinho, Maneh e famílias, pela doação do sorgo e pela ajuda de campo.

À Senhora Denize Avarizzi e ao seu filho Marcelo, bem como ao Sr. Orlando, pela doação do milho, e à D. Gersy Maragoto e ao Sr. Nelson.

Ao Gustavo Irala e à sua esposa, Márcia, e aos seus filhos.

## **BIOGRAFIA**

HAROLDO SANTIAGO COUTINHO, filho de Arlindo Santiago Coutinho e Ana Ferreira Coutinho, nasceu em 22 de outubro de 1966, em Salinas, Minas Gerais.

Em dezembro de 1984, concluiu o Curso Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Salinas, Minas Gerais.

Em agosto de 1993, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Desenvolve pesquisas sobre o uso de bactérias lácticas na alimentação animal desde setembro de 1993, quando ingressou na empresa Biotecnal Ltda., em Três Corações, Minas Gerais, mais tarde encampada pela empresa Chr. Hansen, de Valinhos, São Paulo. Atualmente trabalha em Poços de Caldas, Minas Gerais, na mesma área de atuação.

Em agosto de 2007, ingressou no Curso de Mestrado Profissionalizante em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, na área de concentração de nutrição de ruminantes.



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Matéria seca.....	2
1.2. Açúcares fermentescíveis .....	2
1.3. Poder tampão das plantas .....	3
1.4. A microbiota das plantas forrageiras.....	3
1.4.1. Enterobactérias .....	3
1.4.2. Bactérias lácticas .....	4
1.4.3. Fungos filamentosos e leveduras.....	4
1.4.4. <i>Bacillus</i> e <i>Clostridium</i> .....	5
1.4.4.1. Culturas starters em silagens.....	6
1.4.4.2. Populações microbianas na avaliação de silagens .....	7
1.4.4.3. Potencial hidrogeniônico (pH) e nitrogênio amoniacal (N-NH <sub>3</sub> /N) em silagens.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	12
3.1. Composição química das silagens.....	12

	<b>Página</b>
3.2. Contagens microbiológicas .....	14
3.3. Ácidos orgânicos .....	16
4. CONCLUSÕES .....	18
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS

BAL = bactérias do ácido lático

CS = carboidratos solúveis em água

CSR = *Clostridium*

ENT = enterobactérias

F/L= fungos e leveduras

LD<sub>50</sub> = dose letal para 50% da população

N-NH<sub>3</sub>/N= nitrogênio amoniacal com base no nitrogênio total

OGM = organismo geneticamente modificado

PB = proteína bruta

pH = potencial hidrogeniônico

ufc/g = unidades formadoras de colônias (por grama)

( ) = velocidade específica de crescimento

$\Delta H_o$  = entalpia-padrão de formação

(G+) = Gram-positivo(a); (G-) = Gram-negativo(a)

NDT = nutrientes digestíveis totais

Aw = atividade de água

## RESUMO

SANTIAGO, Haroldo Coutinho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2009. **Silagens de milho e sorgo tratadas com inoculante microbiano à base de bactérias homo e heteroláticas.** Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientador: Sebastião de Campos Valadares Filho.

O objetivo deste estudo foi avaliar os teores de matéria seca, a relação nitrogênio amoniacal/nitrogênio total, o pH, os teores de proteína bruta, as populações microbianas e as concentrações dos ácidos acético, propiônico e butírico em silagens de milho e sorgo tratadas ou não com inoculantes bacterianos, contendo cepas homoláticas ou homo/heteroláticas. Foram utilizados silos experimentais de 20 litros de capacidade, em um esquema fatorial 2 x 3 (dois tipos de silagem x três inoculantes), em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Observou-se o efeito da interação silagem *versus* inoculante para todas as variáveis avaliadas. Constatou-se que o teor de matéria seca da silagem de milho não foi influenciado ( $P > 0,05$ ) pelos inoculantes. No entanto, para a silagem de sorgo, verificou-se maior valor ( $P < 0,05$ ) naquela tratada com cepas homoláticas. A relação N-NH<sub>3</sub>/N foi menor na silagem de sorgo tratada com inoculante homolático. Independentemente do inoculante usado, observou-se pH mais baixo na silagem de milho. Nas plantas de milho e sorgo, antes da ensilagem, foram registradas populações de bactérias lácticas de 6,5 e 6,2 log ufc/g, enquanto nas silagens estas populações foram da ordem de log 7 e log 6, respectivamente. A contagem de fungos e

leveduras foi maior na silagem de milho. Foi observado maior teor de ácido acético na silagem de milho tratada com inoculante heterolático. Considerando as características avaliadas, as silagens de milho e de sorgo, tratadas ou não com inoculantes bacterianos com cepas homoláticas ou homo/heteroláticas, podem ser consideradas de boa qualidade.

## ABSTRACT

SANTIAGO, Haroldo Coutinho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2009. **Corn and sorghum silages treated with microbial inoculants based on homo and hetero-lactic acid bacteria.** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-adviser: Sebastião de Campos Valadares Filho.

The aim of this study was to evaluate microbial populations, pH, the ammonium nitrogen/total nitrogen ratio, dry matter content, crude protein content, and the concentrations of acetic, propionic, and butyric acids in sorghum and corn silage whether treated or not with two types of bacterial inoculants with only homo-lactic and hetero/homo-lactic strains in 20-L experimental silos. A 2 × 3 factorial scheme (two silages × three inoculants) was adopted in a complete random design with three repetitions. An effect of the interaction silage versus inoculants was observed for all the studied variables. The acid lactic bacteria populations were recorded at 6.5 and 6.2 log cfu/g for the corn and sorghum plants, respectively, before ensilage. For the ammonium nitrogen/total nitrogen ratio, a lower value was observed for the sorghum silage treated with homo-lactic strains, and a higher value of crude protein was also noted in this silage. Higher content of acetic acid was observed for the corn silage treated with hetero/homo-lactic inoculants. Regardless of the inoculants used, lower pH values were observed for the corn silage. Considering the evaluated traits, all the corn and sorghum silages can be rated as having good quality.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de silagem é um dos métodos mais importantes na conservação de plantas forrageiras. No Egito, 1.500 anos antes de Cristo, já era usada na conservação de alimentos.

Em países de clima tropical, como o Brasil, há uma estação chuvosa, de intensa produção vegetal, e outra seca, em que há escassez de alimentos e redução no desempenho animal. Portanto a ensilagem é uma opção interessante na manutenção da produção dos rebanhos, de modo que, atualmente, ela representa um avanço tecnológico nos sistemas de produção de carne e leite, inclusive melhorando os índices zootécnicos.

Nesse contexto, o milho (*Zea mays* L.) pode ser considerado uma forrageira-padrão, por produzir silagem de maior qualidade, acompanhado pelo sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench.), cujo valor nutricional corresponde de 70 a 90% do valor da silagem de milho, porém apresenta maior resistência às variações climáticas. Comprovadamente, essas forrageiras são totalmente viáveis na produção de silagens nos trópicos e a opção para seu cultivo e uso está intrinsecamente ligada às condições climáticas regionais.

Com a implantação do Plano Real em 1994, a atividade agrícola modernizou-se, quebrando paradigmas correntes, e a fim de evitar a queda na produtividade ocasionada pela entressafra (HOMEM DE MELO, 1999) a produção de silagem tornou-se uma ferramenta primordial em estabelecimentos voltados principalmente para a atividade leiteira.

Além da viabilidade econômica, esse processo tem por finalidade reduzir as perdas físicas e nutricionais do material preparado, enquanto a qualidade final do produto fermentado depende de vários fatores, como teor de matéria seca, concentração de açúcares solúveis ou fermentescíveis, poder tampão da planta, tipo de bactéria predominante e velocidade específica de crescimento dos microrganismos envolvidos na fermentação.

### **1.1. Matéria seca**

O teor de matéria seca da forrageira a ser ensilada deve ser de 28 a 35%. Valores acima de 40% dificultam a compactação, criando condições para a predominância da respiração aeróbia, responsável pelo aumento da temperatura e pela perda de energia por calor, além de favorecer o crescimento de fungos. Por outro lado, a ensilagem de plantas forrageiras com elevado teor de umidade torna o ambiente favorável à proliferação de bactérias do gênero *Clostridium*, que promovem fermentação indesejável (SILVA, 2001).

### **1.2. Açúcares fermentescíveis**

Os açúcares fermentescíveis são os principais substratos utilizados pelas bactérias lácticas na fermentação do material ensilado. Para obtenção de uma silagem estável, a forragem deverá conter esses substratos em quantidade suficiente para produção de ácido lático superior a 4% e de ácido acético acima de 200 mMolar, a fim de que esse metabólito aumente a estabilidade aeróbia (KUNG JR., 2003). Glicose, frutose, frutanas e sacarose são os principais carboidratos solúveis usados pelos microrganismos para se multiplicarem durante o processo de ensilagem. A concentração desses açúcares nas plantas depende da espécie, do estágio vegetativo, do solo e das condições climáticas (BOLSEN *et al.*, 1998), e tem correlação direta com a qualidade da massa fermentada obtida (ARCHIBALD *et al.*, 1960).



### **1.3. Poder tampão das plantas**

O poder tampão das plantas é um fator importante a ser considerado na ensilagem. A resistência à queda do pH pode determinar de forma significativa a qualidade do produto final, pois quando o pH se mantém acima de 4,5 há o favorecimento de fermentações indesejáveis e da proteólise. Segundo Butier e Bailey (1973), em pH entre 4,0 e 6,0, 68 a 80% do poder tampão das forragens pode ser atribuído aos ânions (sais de ácidos orgânicos, ortofosfatos, sulfatos, nitratos e cloratos) e entre 10 e 20% se deve à ação das proteínas das plantas. Os principais ácidos encontrados nas gramíneas são o málico, o cítrico e o fosfórico e nas leguminosas, o glicérico. As plantas com maior poder tampão dificultam a queda do pH e, portanto, exigem maior concentração de ácidos orgânicos para atingir pH inibitório dos microrganismos do gênero *Clostridium*.

### **1.4. A microbiota das plantas forrageiras**

A microbiota das plantas forrageiras, em geral, é diferente da observada em suas respectivas silagens. Nas plantas predominam os microrganismos dos gêneros *Aeromonas*, *Celullomonas*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, que são Gram-negativos (G-) aeróbios e quimiorganitróficos, enquanto nas silagens destacam-se os Gram-positivos (G+), produtores de ácidos, alcoóis e outros metabólitos, como bactérias lácticas, fungos e leveduras (WOOLFORD; PAHLOW, 1997).

Existem diversos microrganismos envolvidos no processo fermentativo de forragens verdes, entre eles se destacam as enterobactérias, as bactérias lácticas, os fungos e as leveduras e os *Bacillus* e *Clostridium*.

#### **1.4.1. Enterobactérias**

As enterobactérias são bastonetes Gram-negativos (G-), anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos, catalase positivos, oxidase negativos, amplamente encontrados no solo, na água, nos frutos, nos vegetais, nos grãos e nas plantas forrageiras. As células variam de 0,1 a 1,5  $\mu$ m, possuem mobilidade por flagelos e temperatura ótima de crescimento em torno de 37 °C,

embora algumas espécies cresçam em temperatura entre 25 e 30 °C. Produzem ácidos e gases a partir do metabolismo da glicose e são patógenos potenciais para o homem, os insetos, os animais e as plantas (HOLT *et al.*, 1994). Esses microrganismos são conhecidos genericamente como coliformes e predominam em cortes frescos de milho e alfafa (LIN *et al.*, 1992). Eles influenciam diretamente a qualidade final das silagens, por atuarem na fase aeróbia da fermentação, produzindo principalmente metabólitos de baixo valor nutricional para os ruminantes, e causam perdas de energia na forma de calor e matéria seca por gases.

#### **1.4.2. Bactérias lácticas**

As bactérias lácticas são bastonetes Gram-positivos (G+), catalase positivos, oxidase negativos, quimiorganotróficos, sem mobilidade, amplamente encontrados no meio ambiente e no trato gastrointestinal de animais de sangue quente. As células apresentam de 0,1 a 1,5 µm de comprimento e os metabólitos mais comuns produzidos a partir da glicose são ácidos e gases. Crescem em temperatura variando de 5 a 45 °C e sua temperatura ótima de crescimento é entre 30 e 40 °C, que deve ser atingida pela massa ensilada. Bactérias lácticas têm largo uso industrial e interesse científico, devido ao seu potencial como biopreservantes alimentares (ALEXANDRE, 2002) e destacado papel na fermentação de silagens em geral. É o grupo responsável direto pela síntese dos agentes necessários à preservação da massa ensilada e inclui os gêneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* (ELFERINK *et al.*, 2001; SPARO; MALO, 2001; ENNAHAR *et al.*, 2003), comumente identificados em silagens.

#### **1.4.3. Fungos filamentosos e leveduras**

Os fungos filamentosos são microrganismos aeróbios estritos e, portanto, só se multiplicam após exposição do material ao oxigênio, quando então se tornam visíveis a olho nu, formando placas geralmente nas extremidades. Os gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Diplodia* têm sido encontrados em plantas de milho (DENTI; REIS, 2003) e têm importante papel

na síntese de aflatoxinas presentes em alimentos para animais (MOLLIN, 1999).

As leveduras são anaeróbias facultativas e, ao contrário dos fungos filamentosos, não se encontram em colônias visíveis. Leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Torulopsis* crescem em anaerobiose, convertendo os carboidratos solúveis em CO<sub>2</sub> e etanol. Espécies de leveduras fermentadoras de lactato, como *Candida*, *Hansenula* e *Pichia*, são citadas como predominantes em silagens após abertura do silo (KNICKY, 2005). Essa classe de microrganismos é relevante na fermentação de forrageiras, por ter correlação direta com a estabilidade aeróbia do produto fermentado. Valores acima de 10<sup>5</sup> ufc/g de silagem, após a abertura do silo, conferem baixa estabilidade aeróbia, acarretam perdas de matéria seca na forma de CO<sub>2</sub> e redução do valor energético ocasionada pelo calor, que associado às reações de escurecimento não enzimático resulta em material de baixo valor nutricional (SEALE *et al.*, 1986).

#### **1.4.4. *Bacillus* e *Clostridium***

Os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* compreendem bastonetes Gram-positivos (G+), anaeróbios obrigatórios presentes no solo e que contaminam a forragem durante a colheita. Espécies desses grupos são de extrema importância nas silagens, por serem responsáveis pela produção de ácido butírico e pela proteólise (GIBSON, 1965), e em condições de excesso de umidade podem aumentar a concentração de amônia (NH<sub>3</sub>) no meio. Existem ainda espécies associadas a intoxicações alimentares em animais e no homem.

Na sucessão microbiológica, durante a fermentação, os coliformes estão entre os primeiros a atuarem, produzindo principalmente etanol. Posteriormente, são substituídos por outras bactérias lácticas, como os *Leuconostoc* e *Enterococcus*, que, por sua vez, são sucedidos pelos *Pediococcus* e *Lactobacillus*, responsáveis pela queda do pH abaixo de 4,0, o que é atividade dos *Clostridium* (JANSON, 2005).

A velocidade específica de crescimento ( ) das bactérias lácticas é fundamental na redução das perdas nutricionais em silagens. As perdas durante a fermentação dependem dos nutrientes fermentados e dos

microrganismos envolvidos. A atividade das bactérias do ácido láctico, na prática, gera perda de 2 a 5% da matéria seca (McDONALD *et al.*, 1991).

A preservação da qualidade sensorial, da matéria seca e do valor energético da massa ensilada requer que a respiração aeróbia das plantas, a proteólise, a atividade dos *Clostridium* e a fase aeróbia sejam limitadas, e que para isso ocorra um rápido declínio do pH é essencial (MUCK, 1988).

A respiração aeróbia é exotérmica, com delta  $\Delta H_0$  igual a 674 kcal/mol de glicose, fato que pode elevar a temperatura da massa ensilada até 70 °C, resultando em um produto de qualidade inferior (SEALE *et al.*, 1986).

A conservação da massa ensilada deve-se à anaerobiose, ao pH (entre 3,5 e 4,2) e à presença de antimicrobianos. Ao cessar a fermentação láctica, praticamente não há mais reações bioquímicas ou hidrólise enzimática, todavia, uma vez aberto o silo, fungos e leveduras e outras bactérias anaeróbias podem causar perdas e produzir calor. Caso a população de fungos e leveduras seja maior que  $1,0 \times 10^5$  ufc/g de silagem, a massa exposta poderá se aquecer rapidamente (RANJIT, 2003).

#### **1.4.4.1. Culturas *starters* em silagens**

Pesquisas sobre a função da microbiota na fermentação de forrageiras, iniciadas nos anos de 1960, ampliaram o conhecimento acerca da conservação dessas plantas, e o uso de inoculantes microbianos comerciais (culturas *starters*) passou a ser fato concreto na produção de silagens. Segundo Filya *et al.* (2004), esses produtos são seguros, de fácil manuseio, não corrosivos e não tóxicos para os animais e o homem.

Forrageiras recém-cortadas apresentam alto poder tampão e baixa concentração de bactérias lácticas (LIN *et al.*, 2002). Nesse contexto, o uso de um inóculo adequado pode acelerar o decréscimo do pH, antecipar a inativação enzimática e evitar vias metabólicas deletérias. Segundo Whittenbury (1961), as bactérias lácticas seriam os microrganismos mais indicados, desde que apresentassem características específicas, como via fermentativa homoláctica, alta velocidade específica de crescimento, tolerância à acidez, promoção de rápido declínio do pH, resistência ao calor da fase aeróbia, crescimento em

condições de baixa atividade de água ( $A_w$ ) e ausência de ação sobre ácidos orgânicos.

Esses conceitos foram revistos posteriormente e a investigação de cepas heteroláticas produtoras de outros metabólitos, como os ácidos acético e propiônico, os alcoóis, as bacteriocinas, entre outros, passou a ser amplamente disseminada. Não obstante, mesmo com o avanço das pesquisas com essas cepas ou até mesmo do uso de organismos geneticamente modificados (OGM) em inoculantes comerciais para silagens, em geral, as formulações desses produtos contêm uma espécie de *L. plantarum* associada a determinadas espécies de *Enterococcus* ou *Pediococcus* (REES, 1997).

Para que sejam eficientes, espera-se que os inoculantes bacterianos sejam produzidos, estabilizados e comercializados na forma viável, tenham uma composição de bactérias lácticas apropriadas em quantidade pelo menos dez vezes superior à dos microrganismos autóctones e não sejam usados em baixa concentração (PITT, 1990; NESBAKKEN, 1991). Preconiza-se uma população de bactérias lácticas em torno de  $10^5$  a  $10^6$  ufc/g de forragem fresca no início do processo de fermentação como adequada.

#### **1.4.4.2. Populações microbianas na avaliação de silagens**

Segundo Silva (2007), silagens de boa qualidade devem apresentar as populações de bactérias do ácido láctico em níveis maiores que  $10^6$  ufc/g, enterobactérias, fungos/leveduras, *Bacillus* e *Clostridium* menores que  $1,0 \times 10^2$  ufc/g, além terem cheiro agradável, cor clara, verde-amarelada ou caqui, textura firme, tecidos macios, mas destacáveis das fibras, acidez e gosto ácido típico.

#### **1.4.4.3. Potencial hidrogeniônico (pH) e nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>/N) em silagens**

O potencial hidrogeniônico (pH) e o nitrogênio amoniacal N-NH<sub>3</sub>/N indicam a extensão da fermentação e o grau da proteólise. Um pH final abaixo de 4,20 pode diminuir a população de microrganismos deletérios à silagem, os quais convertem o lactato em butirato (Van SOEST, 1994). Já o nitrogênio

amoniacoal  $N-NH_3/N$  caracteriza o grau da proteólise (MAHANNA, 1993), e quanto mais cedo esta for interrompida, maior valor de nutrientes digestíveis totais (NDT) será alcançado na massa ensilada.

Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos de dois inoculantes bacterianos compostos de cepas homoláticas ou homo/heteroláticas sobre a fermentação de silagens de sorgo e milho, e suas populações microbianas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas dependências da empresa Biotrade, localizada em Poços de Caldas, Minas Gerais, onde as unidades experimentais permaneceram em um galpão coberto.

As variedades usadas foram o sorgo BR601 e o milho AG2040, cultivadas nos municípios de Águas da Prata e Mogi Guaçu, no Estado de São Paulo. O sorgo foi colhido mecanicamente 118 dias após a semeadura, usando-se uma colhedora de forragem acoplada a um trator, e o milho foi colhido manualmente, com o auxílio de um facão, 112 dias após o plantio. Ambas as forrageiras foram picadas em partículas de aproximadamente 2 cm e inoculadas ou não, conforme o tratamento, usando-se um aplicador manual marca Jacto de 1,25 L de capacidade. O material foi ensilado em baldes de plásticos (silos experimentais) com capacidade de 20 litros, dotados de válvula de Bunsen. Os baldes, após o enchimento, foram transportados para o município de Poços de Caldas, onde foram mantidos em local coberto até os 60 dias após a ensilagem, no caso das silagens de sorgo, e 24 dias, para as silagens de milho.

Adotou-se um esquema fatorial 2 × 3 (duas silagens e três inoculantes), em delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições. As duas formulações do inoculante bacteriano MasterSilo apresentavam os seguintes níveis de garantia em ufc/g de microrganismos: Inoculante heterolático: *Lactobacillus*

*brevis*,  $1,0 \times 10^{10}$ ; *Lactobacillus rhamnosus*,  $1,0 \times 10^{10}$ ; *Lactobacillus plantarum*,  $2,0 \times 10^{10}$ ; *Pediococcus pentosaceus*,  $1,0 \times 10^{10}$ . Inoculante homolático: *Lactobacillus plantarum*,  $2,5 \times 10^{10}$ ; *Pediococcus acidilactici*,  $2,5 \times 10^{10}$ . As cepas para formulação desses inoculantes foram fornecidas pelas empresas Sacco e Danisco Brasil, respectivamente.

Na ocasião da abertura dos silos, foram colhidas amostras para determinação do pH, do nitrogênio amoniacal e dos ácidos orgânicos.

As determinações de pH, nitrogênio amoniacal, proteína bruta e matéria seca foram feitas no Laboratório de Forragicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Em amostras de 25 g de silagem, foram adicionados 100 mL de água destilada, e após repouso por 2 horas foram feitas as leituras de pH, utilizando-se um potenciômetro Digimed TM20. Em outra amostra de 25 g, foram adicionados 200 mL de uma solução de  $H_2SO_4$ , 0,2 N. Esse material foi mantido em repouso em geladeira por 48 horas e, em seguida, foi filtrado em papel-filtro tipo Whatman<sup>®</sup> 54. No filtrado, determinou-se o teor de N-amoniacal, segundo Bolsen *et al.* (1992).

Outras alíquotas das amostras das silagens foram pré-secas por 72 horas em estufa de ventilação forçada a 60°C. Em seguida, foram processadas em moinho estacionário Thomas Wiley, com peneira de malha de 1 mm, e acondicionadas em frascos de polietileno de alta densidade, que foram lacrados com selo de alumínio para posterior determinação dos teores de matéria seca (MS), em estufa a 105°C, e de proteína bruta, pelo método Kjeldahl.

A determinação dos ácidos orgânicos (acético, propiônico e butírico) foi feita no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Em 10 g de silagem fresca, foram adicionados 90 mL de água destilada estéril e misturados em liquidificador por 30 segundos. Em seguida, fez-se uma filtração simples. Dos extratos obtidos, retirou-se uma alíquota de 1 mL, que foi transferida para um tubo de ensaio com 2 mL de ácido metafosfórico (20% p/v), de onde se retirou uma nova alíquota, que foi transferida para um espendorfe para posterior leitura de absorvância em um cromatógrafo SHIMADZU SPD-10 A VP, com detector ultravioleta (UV), usando-se um comprimento de ondas de



210 nm, coluna C18 (fase reversa), com pressão de coluna de 137 kgf, e ácido fórmico 0,1% aquoso como fase móvel, num fluxo de 1,0 mL/minuto com volume injetado de 20 L.

As contagens das populações microbianas foram feitas no laboratório Microbial, localizado em Campinas, São Paulo. Em 10 g de silagem, colhidos aleatoriamente nas forragens e nas silagens, adicionaram-se 90 g de água destilada, procedendo-se em seguida à fragmentação em liquidificador industrial por 30 segundos, seguida de filtração simples. Da solução obtida, pipetou-se 0,1 mL ou 1 mL para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução tampão (pH 7,2). As diluições variaram entre  $10^{-2}$  e  $10^{-6}$  e o plaqueamento, para cada diluição, foi feito em duplicata.

As populações microbianas foram determinadas em meios de culturas específicos, conforme os seguintes protocolos: Agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS, DIFCO-DETROIT/USA), para contagem de bactérias lácticas, após incubação por 48 horas em estufa à temperatura controlada (37°C); Ágar sulfito polimixina sulfadiazina (SPS, DIFCO-DETROIT/USA), para contagem de *Clostridium* sulfito redutores sp., após incubação por 48 horas em temperatura de 35 a 37 °C; Ágar batata dextrose (BDA), para contagem de fungos e leveduras, após incubação por seis a sete dias à temperatura ambiente em pH do meio de cultura igual a 4,5; e Ágar violeta *red bile* (VRB, DIFCO-DETROIT/USA), para contagem de enterobactérias, após incubação por 48 horas em temperatura de 32 °C. Foram consideradas passíveis de contagem aquelas placas que apresentaram entre 25 e 250 unidades formadoras de colônias (UFC).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, aplicando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade na comparação das médias, usando-se o programa SAEG versão 8.0 (UFV, 2000).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Composição química das silagens

Todas as silagens apresentaram cheiro agradável, cor amarelada ou caqui, com textura firme. Observou-se efeito da interação inoculante *versus* silagem sobre o teor de matéria seca, o nitrogênio amoniacal N-NH<sub>3</sub>/N, o pH e os teores de proteína bruta das silagens (Tabela 1).

O teor de matéria seca da silagem de milho não foi influenciado ( $P > 0,05$ ) pelos inoculantes. No entanto, para a silagem de sorgo, constatou-se maior valor ( $P < 0,05$ ) naquela tratada com cepas homoláticas, provavelmente em função da menor extensão da proteólise, já que essa silagem apresentou o menor teor de nitrogênio amoniacal. Avaliando o efeito de inoculante dentro de silagem, observou-se que o teor de matéria seca foi menor nas silagens de sorgo-controle e tratada com cepas heteroláticas. Pedroso *et al.* (2002), em um estudo com silagens de sorgo, não observaram efeito de um inoculante bacteriano homolático, contendo cepas de: *L. plantarum*, *Enterococcus faecium* e *Pediococcus acidilactici*, sobre a qualidade da silagem e a perda de matéria seca.

A menor relação N-NH<sub>3</sub>/N ( $P < 0,05$ ) foi observada na silagem de sorgo tratada com o inoculante à base de bactérias homoláticas. Por outro lado, não se observou ( $P > 0,05$ ) efeito de inoculante na silagem de milho. Quando o efeito da silagem foi avaliado dentro de inoculante, o menor teor N-NH<sub>3</sub>/N foi

observado na silagem de sorgo tratada com bactérias homoláticas. Considerando que, de acordo com Mahanna (1993), silagens estáveis de gramíneas ou leguminosas apresentam teor de N-NH<sub>3</sub>/N abaixo de 15%, pode-se afirmar que todas as silagens foram de boa qualidade. Silva (2001) detectou valores de 4,2 a 4,8 e de 5,0 a 5,5, respectivamente, em silagens de sorgo e milho tratadas com dois inoculantes comerciais à base de bactérias homoláticas, um deles associado a enzimas amilolíticas e celulolíticas.

Avaliando-se o efeito de silagem dentro de inoculante, observou-se que o pH de nenhuma das silagens foi influenciado ( $P>0,05$ ) pelo inoculante. Todavia, independentemente do inoculante, o pH foi menor ( $P<0,05$ ) para as silagens de milho, embora os valores tenham-se mantido na faixa aceita como silagens de boa qualidade na fermentação (3,5 a 4,5), conforme relatos de Fisher e Burns (1987). A velocidade de declínio do pH é fator importante na ensilagem, por ter influência sobre a atividade enzimática e a proteólise, conseqüentemente sofre o valor nutricional do material ensilado. Ensilando alfafa tratada com uma mistura de *L. plantarum*, *E. faecium* e *P. acidilactici*, Jones *et al.* (1992) concluíram que a taxa de redução diária do pH foi de 0,85 para a silagem-controle e 2,31 para a silagem tratada, todas com 33% de MS.

Tabela 1 – Valores médios de matéria seca (MS), nitrogênio amoniacal N-NH<sub>3</sub>/N, pH e proteína bruta (PB) e das silagens de sorgo e milho em função dos inoculantes microbianos

Silagem	Controle	Inoculante	
		Heterolático	Homolático
Matéria seca (%)			
Milho	32,16aA	33,43aA	30,87aA
Sorgo	21,64bB	23,12bB	31,70aA
N-NH <sub>3</sub> /N <sup>1</sup> (%)			
Milho	4,00aA	4,14aA	4,81aA
Sorgo	5,17aA	4,82aA	1,95bB
pH			
Milho	3,71 aB	3,71 aB	3,66aB
Sorgo	3,94aA	3,92aA	3,95aA
Proteína bruta <sup>2</sup> (%)			
Milho	8,62aA	7,86aA	6,78bB
Sorgo	6,23bB	6,31bB	7,16aA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e de letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5%, pelo teste Tukey. <sup>1</sup>Com base no nitrogênio total e <sup>2</sup>Com base na matéria seca total.

Ao avaliar o efeito de silagem, dentro de inoculante, sobre o teor proteico da silagem, observou-se efeito de inoculante somente sobre a silagem de sorgo, registrando-se maior na silagem tratada com cepas homoláticas. No entanto, quando se avaliou o efeito de inoculante dentro de silagem, o menor teor de proteína bruta foi observado nas silagens de sorgo-controle e tratada com cepas heteroláticas.

Valadares Filho *et al.* (2006) citam valores de 6,66% para silagens de sorgo forrageiro (N = 43 amostras), de 7,06 (N = 339 amostras) para silagens de milho e de 7,06% (N = 1 amostra) para silagem de milho com 30 a 45% de espigas, caso do milho usado neste estudo. Valores bem próximos aos deste estudo foram reportados por Silva (2001), que encontrou valores entre 6,97 e 7,42% de proteína bruta em silagens de milho usando dois inoculantes comerciais à base de bactérias homoláticas, um deles associado a enzimas amilolíticas e celulolíticas. Souza *et al.* (2000) relataram valores entre 6,87 e 8,00% em estudo com 12 variedades de milho testadas em condições tropicais, enquanto Pimentel *et al.* (1998) descreveram valores de PB entre 6,03 e 7,20% em pesquisa com sete variedades de sorgo forrageiro.

### 3.2. Contagens microbiológicas

As populações de bactérias lácticas, fungos e leveduras nas plantas de milho e sorgo, assim como as de enterobactérias nas plantas de sorgo e as de *Clostridium* nas de milho antes da ensilagem (Tabela 2), encontram-se dentro da faixa normalmente registrada para essas culturas.

Tabela 2 – Valores médios (UFC/g) das populações microbianas nas plantas de milho e de sorgo

	Forragem	
	Milho	Sorgo
Bactérias lácticas	6,5	6,2
<i>Clostridium</i>	1,6	nd*
Fungos e leveduras	5,7	6,4
Enterobactérias	nd*	6,3

\* não determinado.

A população de bactérias produtoras do ácido lático nas silagens de milho tratadas com inoculante foi mais elevada que nas silagens de sorgo, provavelmente em virtude da contribuição desses microrganismos via inoculante. A contagem de fungos e leveduras foi maior na silagem de milho, independentemente do inoculante (Tabela 3). Os valores encontrados, com exceção de fungos e leveduras nas silagens de sorgo, estão de acordo com os observados por Silva (2001), que constatou valores médios de 6,8; < 2; e 6,4 UFC/g para bactérias lácticas, enterobactérias e fungos e leveduras, respectivamente, em silagens de milho com 28 dias de fermentação e 6,4; < 2; e 5,5 UFC/g em silagens de sorgo após 56 dias de fermentação, ambas tratadas com dois inoculantes à base de cepas homoláticas.

Tabela 3 – Populações microbianas (UFC/g) em silagens de milho e sorgo tratadas com inoculantes microbianos

Silagem	Controle	Inoculante	
		Heterolático	Homolático
Bactérias lácticas			
Milho	6,9	7,1	7,1
Sorgo	5,8	5,8	6,5
Fungos/leveduras			
Milho	5,2	5,4	5,9
Sorgo	<2,4	<2,0	<3,3
<i>Clostridium</i>			
Milho	<1,0	<1,38	1,9
Enterobactérias			
Sorgo	<3,0	<2,0	<2,0

Em outro trabalho com silagens de milho tratadas com inoculante bacteriano com cepas homoláticas, à base de *L. plantarum* e *P. cerevisiae*, após 120 dias de fermentação, Bolsen *et al.* (1992) obtiveram valores de 8,6, 6,9 e 6,6 UFC/g para bactérias lácticas, enterobactérias e fungos e leveduras, respectivamente; de 5,7 a 6,0 para leveduras assimiladoras de lactato; e de 2,3 a 2,6 para esporos de *Clostridium* fermentadores de lactato.

Os resultados obtidos neste trabalho estão em consonância com Bernardes *et al.* (2007), que registraram valores de 4,3 a 9,0 UFC/g para bactérias lácticas e < 2 para leveduras e fungos filamentosos em silagens de

sorgo e milho tratadas com um inoculante à base de bactéria heterolática (*L. buchneri*).

Resultados de outros estudos têm comprovado que cepas heterofermentativas são mais eficientes na conservação de forragens com alto teor de carboidratos solúveis (RANJIT *et al.*, 2002), o que justifica o uso dessas cepas em inoculantes microbianos, e não de apenas cepas homoláticas, como inicialmente postulado por Whittenbury (1961).

### 3.3. Ácidos orgânicos

Observou-se efeito da interação silagem *versus* inoculante para os teores dos ácidos orgânicos (Tabela 4). Na avaliação do efeito de inoculante dentro de silagem, o maior teor ( $P < 0,05$ ) de ácido acético foi observado na silagem de milho tratada com inoculante heterolático. Quando se avaliou o efeito de inoculante dentro de silagem, o maior teor de ácido acético ocorreu na presença do inoculante heterolático, na silagem de milho, enquanto nas silagens de sorgo, controle e com inoculante homolático os teores de ácido acético foram superiores aos da silagem de milho.

Tabela 4 – Teores médios<sup>1</sup> dos ácidos acético, propiônico e butírico em silagens de milho e sorgo tratadas com inoculantes microbianos

Silagem	Controle	Inoculante	
		Heterolático	Homolático
Acético			
Milho	0,79bB	1,61aA	0,53cB
Sorgo	1,06aA	0,71bB	1,08aA
Propiônico			
Milho	0,33bB	0,34bB	0,61aA
Sorgo	0,39aA	0,44aA	0,25 bB
Butírico			
Milho	0,08bA	0,09aB	0,03cB
Sorgo	0,05cB	0,20 aA	0,16 bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si a 5%, pelo teste Tukey.

<sup>1</sup>% da MS.

De fato, esperava-se que o teor de ácido acético fosse maior nas silagens tratadas com cepas heteroláticas, contudo este efeito não foi consistente. A inclusão da cepa de *L. brevis* foi realizada na expectativa de que o teor de ácido acético superasse os 1,20% (p/p), equivalente a LD<sub>50</sub> de 200 mMolar, citados por Ranjit e Kung Jr. (2000) como de efetiva ação fungistática, uma vez que a contagem de fungos e leveduras nas silagens de sorgo foi < 2 UFC/g. Esses autores observaram que mesmo com uma concentração de 1,88% de acetato em silagens de milho o número de fungos e leveduras foi de 5,85 e com 3,6%, e a contagem foi < 2 UFC/g, após 100 dias de fermentação.

O teor de ácido propiônico na silagem de milho-controle e naquela tratada com inoculante heterolático foi menor ( $P < 0,05$ ) que nas silagens de sorgo (Tabela 4). Quando avaliado o efeito de silagem dentro de inoculante, constatou-se que o teor de ácido propiônico foi maior na silagem de milho com cepas homoláticas, enquanto na silagem de sorgo o uso desse inoculante resultou no menor teor desse ácido. Os teores de ácido propiônico estão dentro da faixa de silagens de boa qualidade, que é de 0 a 1%, segundo Mahanna (1993).

Para o ácido butírico, constatou-se menor valor ( $P < 0,05$ ) na silagem de milho como cepa homolática, enquanto na silagem de sorgo observou-se menor valor na silagem-controle. Destaca-se ainda que as silagens de sorgo tratadas com inoculantes apresentaram maior teor de ácido butírico que as de milho. No entanto, os valores encontrados permitem classificar as silagens como de boa qualidade, possivelmente devido à baixa proteólise ocorrida durante a fermentação.

#### **4. CONCLUSÕES**

Todas as silagens podem ser classificadas como de boa qualidade, com base nos valores de pH, nitrogênio amoniacal e ácidos orgânicos.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R. *et al.* Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, 2002.

ARCHIBALD, G.; KUMESKI, RUSSEL, S. Grass Silage Quality as Affected by Crop Composition and by Additives, **Journal of Dairy Science**, v. 43, n. 11, p. 1648-1653, 1960.

BERNARDES, T. F.; SILVEIRA, R. N.; COAN, R. M. Avaliação de silagens de plantas de milho e de sorgo inoculadas com *Lactobacillus buchneri* 40788 ou *Lactobacillus plantarum*. In: CONGRESSO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 2., 2007. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2007. 117 p.

BOLSEN, K. K.; LIN, C.; BRENT, B. E. *et al.* Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 11, p. 3066-3083, 1992.

BOLSEN, K. K.; HIGGINBOTHAM, G. E.; MUELLER S. C. *et al.* Effect of a propionic acid bacterial inoculant on fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 81, Issue 8, august 1998, p. 2185-2192, 1998.

BOSSHARDT, D. K.; BENDER, C. B. Grass silage: a critical review of the literature. **Journal of Dairy Science**, v. 22, n. 8, p. 637-651, 1939.

BUTLER, G. W.; BAILEY, R. W. Chemistry and biochemistry of herbage. **Academic Press**, London, New York, 1973. 295 p.

DENTI, E. A.; REIS, E. M. Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação de danos em lavouras de milho do Planalto Médio Gaúcho e dos Campos Gerais do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 585-590, 2003.

ELFERINK O.; STEFANIE, J.W.H.; DRIEHUIS, F. et al. Silage fermentation processes and their manipulation. **FAO Plant Production and Protection Papers**, p.161-196, 2001.

ENNAHAR, S.; CAI, Y.; FUJITA, Y. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 444-451, 2003.

FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal Applied Microbiology**, v. 97, p. 818-821, 2004.

FISCHER, D. S.; BURNS, J. C. Effects of forage carbohydrate constituents ensilage fermentation. Quality analysis of summer annual forages II. **Agronomy Journal**, v. 79, p. 242–248, 1987.

GIBSON, T. *Clostridia* in Silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 28, n. 1, p. 56-62, 1965.

HOLT, J.; KRIEG, G.; NOEL, R. *et al.* Berguey's manual of determinative bacteriology. 9. ed. **Library of congress cataloguing-in-publication data**. Baltimore: Maryland, 1994. p. 175-176.

HOMEM DE MELO, F. A abertura comercial e o papel dos aumentos de produtividade na Agricultura brasileira. Disponível em: <<http://www.ifb.com.br/documentos/hdemelo.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2009,

JANSSON, S. Lactic acid bacteria in silage: growth, antibacterial activity and antibiotic resistance. Department of Microbiology Master thesis **Swedish University of Agricultural Sciences**. Uppsala, 2005. 34 p.

JONES, B. A.; SATTER, L. D.; MUCK, R. E. Influence of bacterial inoculants and substrate addition to Lucerne ensiled at different dry matter contents. **Grass and Forage Science**, v. 47, n. 19-27, 1992.

KNICKÝ, M. Possibilities to improve silage conservation – effects of crop, ensiling technology and additives. Doctoral thesis. **Swedish University of Agricultural Sciences**, Uppsala, 2005. 34 p.

KUNG JR., L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage Additives. In: SILAGE SCIENCE AND TECHNOLOGY. **American Society of Agronomy**, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, 2003. p. 305-360.

LIN, C.; BOLSEN, K. K.; BRENT, B. E. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3066-3083, 1992.

MAHANNA, B. Troubleshooting silage problems. In: STATE APPLIED NUTRITION CONFERENCE, 4., 1993, Wisconsin. **Proceedings...** Wisconsin, 1993. p. 1-21.

McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **Biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe Publication, 1991. 340 p.

MOLIN, R. Ocorrência de micotoxinas em estágios fenológicos próximos da colheita de milho In: SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1999, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Fundação Cargill, 1999. p. 57-80.

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

NESBASKKEN, T.; BROCH-DUE, M. Effects of commercial inoculants of lactic acid bacteria on the composition of silages made from grasses of low dry matter content. **Journal Science Food Agriculture**, v. 54, p. 177-190, 1991.

PEDROSO A. F.; SOUZA, A. R.; FREITAS S. G. B. Efeito de inoculante bacteriano sobre a qualidade da silagem e perda de matéria seca durante a ensilagem de sorgo. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 48-52, 2000.

PIMENTEL, J. J.; DA SILVA, J. F. C.; VALADARES FILHO, S. C. *et al.* Efeito da suplementação protéica no valor nutritivo de silagens de milho e sorgo. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 27, n. 5, p. 1042-1049, 1998.

PITT, R. E. The probability of inoculants effectiveness in alfalfa silages. **Transactions of the ASAE**, v. 33, n. 6, p. 1771-1778, 1990.

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

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

REES, T. J. The development of a novel antifungal silage inoculant. Doctoral Research Thesis. **Biotechnology Centre**, Cranfield University, UK, 1997.

SPARO, M. D.; MALO, R. A. Evaluation of the bacterial flora in natural corn silage. **Rev. Argentina Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 75-80, 2001.

SEALE, D. R.; HENDERSON, A. R.; PETTERSSON, K. O. *et al.* The effect of addition of sugar and inoculation with two commercial inoculants on the fermentation of Lucerne silage in laboratory silos. **Grass and Forage Science**, v. 41, n. 1, p. 61-70, 1986.

SILVA, A. V. **Populações microbianas em plantas de milho e sorgo, produtos da fermentação e desempenho de bovinos de corte, suplementados ou não com suas silagens, tratadas com Inoculantes microbianos**. 2001. 122 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2001.

SILVA, D. J.; QUEIRÓZ, A. C. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed., Viçosa-MG, 2002. p. 97-115.

SILVA, M. J. Silagem de forrageiras tropicais. **Informe Técnico Embrapa**, n. 51. Campo Grande-MS, agosto, 2001.

SOUZA, G. A.; FLEMMING, J. S.; FLEMMING, R. *et al.* Avaliação de cultivares de milho para produção de silagem de alta qualidade. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 107-110, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas – SAEG**. Versão 8.0, Viçosa-MG. 2000. 142 p.

VALADARES FILHO, S. C.; ROCHA JR., V. R.; CAPELLE, E. R. *et al.* **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p. 210-215.

van SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WHITTENBURY, R. **An investigation of the lactic acid bacteria**. Ph.D. Thesis, University of Edinburgh, UK, 1961.

WOOLFORD, M. K.; PAHLOW, G. The silage fermentation. **Microbiology of Fermented Foods**, v. 1, p. 73-102, 1997.