



GABRIELLI FERNANDA DA COSTA

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE *Lactobacillus buchneri* E
Lactobacillus diolivorans SOBRE A ESTABILIDADE AERÓBIA
DE SILAGEM DE GRÃOS DE MILHO RECONSTITUÍDOS**

**LAVRAS – MG
2019**

GABRIELLI FERNANDA DA COSTA

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE *Lactobacillus buchneri* E *Lactobacillus diolivorans*
SOBRE A ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGEM DE GRÃOS DE MILHO
RECONSTITUÍDOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Zootecnia, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Thiago Fernandes Bernardes
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

GABRIELLI FERNANDA DA COSTA

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE *Lactobacillus buchneri* E *Lactobacillus diolivorans*
SOBRE A ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGEM DE GRÃOS DE MILHO
RECONSTITUÍDOS**

**ASSOCIATION EFFECT BETWEEN *Lactobacillus buchneri* AND *Lactobacillus*
diolivorans ON AEROBIC STABILITY OF REHYDRATED CORN GRAIN SILAGE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Zootecnia, para a
obtenção do título de Bacharel.

Dr. Prof. Thiago Fernandes Bernardes UFLA
Msc. Marcus Vinicius Santa Brígida Cardoso UFLA
Msc. Luciana Miranda Lima UFLA

Dr. Prof. Thiago Fernandes Bernardes
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora pelo dom da vida e sempre iluminar meu caminho. À minha família por todo apoio, meus pais José Vitor e Lucélia, que muitas vezes sem poder não mediram esforços para realização dos meus sonhos, especialmente minha mãe que é uma guerreira e cuida muito bem de nós quatro, meus irmãos Tamara e Elton que mesmo com muitas brigas e ciúmes, estiveram sempre me apoiando e tenho certeza que sempre estaremos unidos nos ajudando.

À Universidade Federal de Lavras e ao departamento de zootecnia por todo suporte e aprendizado nesses anos. Ao meu orientador Thiago Fernandes Bernardes que além de um excelente professor, também foi um orientador com quem aprendi muito, sempre presente em nossas atividades e que também sempre está disposto a nos ajudar.

Agradeço os núcleos de estudos que participei Nefor, Uflaleite e Nel, onde consegui aprender um pouco mais que só nas aulas e desenvolver também como pessoa, fiz amigos que levarei sempre comigo. Em especial o grupo da conservação que durante esse último ano foi onde pude me encantar com alimentos conservados e, Marcus que além de um pardal e me jogar muito serviço haha se tornou um grande amigo e esteve comigo durante todo meu experimento, me aguentando e me ensinando muito.

Agradeço também a Leticia Gabriela que foi a melhor companheira que pude arrumar desde os trotes de caloura até agora que é como uma irmã. A Thalita outra grande parceira, que mesmo estando distante sempre acompanhou e torceu por mim. A república Mónarquia que tornou uma família em Lavras e compartilhamos momentos incríveis. As meninas do apartamento 301 que estão comigo no dia a dia e além de dividir contas também somos uma família. Agradeço a todos amigos e colegas da zootecnia que dividiram momento de muitos estudos e também de alegrias. Não posso deixar de agradecer ao Edmilson que chegou agora e está ao meu lado todo momento.

RESUMO

O uso de silagens de grãos de milho reconstituído está aumentando no cenário da pecuária atual, contudo, a intensidade do processo de deterioração desses tipos de alimentos é considerada alta, por serem altamente susceptíveis à atividade de microrganismos deterioradores. Objetivou-se avaliar a efetividade de um inoculante bacteriano em controlar o processo de deterioração e auxiliar na estabilidade aeróbia de silagens de grãos de milho reconstituídos. Os tratamentos consistiram em: silagem de grão de milho reconstituído sem aditivo (CONTROL); silagem de grão de milho reconstituído inoculada com cepas de bactérias *L. plantarum* DSM 12837, *L. buchneri* DSM 12856 e *L. rhamnosus* NCIMB 30121 (LP+LB); e silagem de grão de milho reconstituído inoculada com cepas de bactérias *L. rhamnosus* NCIMB 30121, *L. buchneri* DSM 12856 e *L. diolivorans* DSM 32074 em duas dosagens: normal (LB+LD) e dosagem dupla (2LB+2LD). As silagens confeccionadas permaneceram estocadas durante 60 dias. A dosagem aplicada foi de $2,5 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ de massa verde para os tratamentos CONTROL, LP+LB e LB+LD, para o tratamento 2LB+2LD a dosagem foi de $5,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ de massa verde. Foi compactado, em média, 5,353 kg de forragem em silos experimentais (5 L), alcançando uma densidade de $1.000 \pm 6,80$ kg.m⁻³, aproximadamente. As variáveis MS, pH, produtos finais da fermentação e contagem de microrganismos das silagens foram avaliados. As silagens foram submetidas a um teste de deterioração e estabilidade aeróbia por 10 dias. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e sete repetições, totalizando vinte e oito unidades experimentais. As variáveis foram analisadas utilizando o procedimento PROC GLM do SAS (SAS Institute). As médias foram comparadas pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. Não houve diferença ($P = 0,8876$) entre os teores de MS das silagens. Silagens que receberam a dosagem dupla (2LB+2LD) obtiveram maiores valores de pH (3,87) em relação às demais silagens ($P < 0,0001$). A contagem de leveduras foi menor para as silagens 2LB+2LD ($P < 0,0001$), bem como também tiveram maior contagem de bactérias ácido láctica ($P < 0,0001$). A contagem de fungos filamentosos não diferiu entre as silagens ($P = 0,0910$). As concentrações de ácido láctico foram superiores nas silagens LP+LB ($P = 0,0010$), enquanto que as concentrações de ácido acético e ácido propiônico foram maiores nas silagens 2LB+2LD ($P < 0,0001$). As concentrações de etanol e 1,2-propanodiol também foram mais elevadas nas silagens que receberam dosagem dupla do inoculante bacteriano ($P < 0,0001$). As perdas de matéria seca foram menos intensas nas silagens 2LB+2LD ($P = 0,0001$). Houve um acréscimo de aproximadamente 113 horas na estabilidade aeróbia das silagens 2LB+2LD em comparação às demais silagens ($P < 0,0001$). Em adição, uma redução de aproximadamente 14 °C no acúmulo de temperatura foi observado para estas mesmas silagens ($P = 0,0004$). Silagens que receberam a dosagem dupla do inoculante bacteriano (2LB+2LD) apresentaram um melhor perfil de fermentação, bem como melhores respostas na estabilidade aeróbia e menor atividade metabólica dos microrganismos deterioradores.

Palavras-chave: Processo de deterioração. Estabilidade aeróbia. Inoculantes bacterianos. Silagem de grãos de milho reconstituídos.

ABSTRACT

The use of corn grain silages is increasing in the current livestock scenario, however, the intensity of the deterioration process of these feeds is considered high, due the metabolic activity of spoilage microorganisms. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of a bacterial inoculant in control the deterioration process and improve the reconstituted grain corn silage aerobic stability. The treatments was: reconstituted corn grain silage without inoculant (CONTROL); inoculated reconstituted corn grain silage with *L. plantarum* DSM 12837, *L. buchneri* DSM 12856 and *L. rhamnosus* NCIMB 30121 (LP + LB); and inoculated reconstituted corn grain silage with *L. rhamnosus* NCIMB 30121, *L. buchneri* DSM 12856 and *L. diolivorans* DSM 32074 in two dosages: normal (LB + LD) and double dosage (2LB + 2LD). The silages were stored for 60 d. The dosage was 2.5×10^5 CFU.g⁻¹ fresh mass for CONTROL, LP + LB and LB + LD treatments, for 2LB + 2LD treatment the dosage was 5.0×10^5 CFU.g⁻¹ of fresh mass. An average, 5.353 kg of reconstituted grain was packed in experimental silos (5 L), achieving a density of approximately $1.000 \pm 6,80$ kg.m⁻³. Dry matter, pH, fermentation end-products and microorganisms count of silages were evaluated. The silages were subjected to an aerobic stability and deterioration assay for 10 days. A completely randomized design with four treatments and seven replications was used, totaling twenty-eight experimental units. The variables were analyzed with the PROC GLM procedure of the SAS (SAS Institute). The means were compared by Student's t-test at 5% level. There was no difference ($P = 0.8876$) between the silage DM contents. Silages with double dosed (2LB + 2LD) had higher pH values (3.87) than other silages ($P < 0.0001$). The yeast count was lower for 2LB + 2LD silages ($P < 0.0001$), as well as higher lactic acid bacteria count ($P < 0.0001$). The filamentous fungi count did not differ between silages ($P = 0.0910$). The lactic acid concentrations were higher for LP + LB silages ($P = 0.0010$), while acetic acid and propionic acid concentrations were higher for 2LB + 2LD silages ($P < 0.0001$). The ethanol and 1,2-propanediol concentrations were also higher in silages that received double dosage of bacterial inoculant ($P < 0.0001$). The dry matter losses were less intense for 2LB + 2LD silages ($P = 0.0001$). There was an increase of approximately 113 hours in aerobic stability for 2LB + 2LD silages in compared to other silages ($P < 0.0001$). In addition, a reduction of approximately 14 °C in temperature accumulation was observed for these same silages ($P = 0.0004$). The silages that received double dosage of bacterial inoculant (2LB + 2LD) have a better fermentation profile, as well as better responses in aerobic stability and lower metabolic activity of spoilage microorganisms.

Keywords: Deterioration process. Aerobic stability. Bacterial inoculants. Reconstituted corn grain silages.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1	Silagem de milho	9
2.2	Grãos de milho reconstituídos.....	9
2.3	Deterioração aeróbia e microrganismos indesejáveis na silagem.....	10
2.4	Inoculantes bacterianos	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1	Preparo das silagens e tratamentos	15
3.2	Análises e preparo das amostras.....	17
3.3	Análise estatística	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
5	CONCLUSÃO.....	24
6	IMPLICAÇÕES	24
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

A produção de alimentos conservados tem sido mais frequente nos sistemas de produção no Brasil. Dentre esses alimentos conservados estão as silagens grãos de milho reconstituídos, que consiste no processo de reidratação do grão de milho seco moído. Este é considerado um método de conservação eficiente nos sistemas pecuários de corte e leite, visto que traz benefícios para o sistema no que se refere em melhorias no seu valor nutritivo e na eficiência alimentar dos animais (Bernardes et al. 2014). Contudo, por conter amido como carboidrato reserva nos grãos de milho dispõe de muito carboidratos solúveis, que são substratos para microrganismos no processo de fermentação e produção de ácido lático pelas bactérias do ácido lático. O ácido lático por sua vez, serve como substrato para microrganismos indesejáveis quando a silagem entre em contato com o oxigênio, tornando um alimento altamente fermentável e também propenso à alta atividade de microrganismos deterioradores de silagem (Weinberg; Muck, 1996).

Dentre os microrganismos capazes de deteriorar a massa ensilada, leveduras, fungos filamentosos e algumas bactérias aeróbias (*Bacillus*, *Listeria*, *Bactérias acéticas*) são capazes de consumir carboidratos residuais e produtos finais de fermentação no painel do silo (Lidgren et al., 2002). Em consequência disto, têm-se o aumento do pH e da temperatura do material ensilado, causando perdas de matéria seca e diminuindo o valor nutricional da silagem.

Em silagens, são recomendados no mínimo 60 dias de estocagem para que ocorra uma melhor digestibilidade do amido pela atividade de bactérias, enzimas, fungos e produtos finais de fermentação. Durante os primeiros 60 dias aumenta em 0,5% a digestibilidade do amido por dia estocado, depois o incremento cai para 0,05% (Bernardes et al. 2014). E períodos de estocagem mais longos (e.g. 90 dias) são recomendados (DANIEL et al., 2014) para que tenha uma produção de ácidos com ação antifúngica, como o acético e propiônico, em quantidades suficientes para inibir o crescimento de leveduras e fungos filamentosos e assim uma melhor estabilidade aeróbia.

O uso de inoculante bacteriano com a associação de cepas diferentes de bactérias homofermentativas (*L. plantarum* e *L. rhamnosus*) e heterofermentativas (*L. buchneri* e *L. diolivorans*), com a combinação de seus produtos finais podem contribuir com o perfil fermentativo da silagem, aumento da estabilidade e diminuir a deterioração aeróbia. A associação de *L. buchneri* e *L. diolivorans* pode melhorar a estabilidade e controlar a deterioração aeróbia. Com isso, objetivou-se avaliar a efetividade de inoculante bacteriano em

controlar o processo de deterioração e auxiliar na estabilidade aeróbia de silagens de grãos de milho reconstituídos estocados por 60 dias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Silagem de milho

A confecção de silagem de milho é tradicionalmente aplicada em sistemas de produção animal no Brasil, principalmente por fornecer amido e fibra, tendo um cultivo mais difundido quando comparado à outras culturas agrícolas. Além de adaptar-se muito bem ao clima tropical, com alta produção de matéria seca (MS) e apresentar características desejáveis (teor de matéria seca, concentração de carboidratos solúveis e poder tampão) para o processo de ensilagem, a planta de milho possui um baixo teor de fibra em detergente neutro (FDN) e um alto teor de carboidratos não fibrosos (CNF), reduzindo a necessidade de amido advindo de concentrados, tornando de vital importância na viabilidade do processo produtivo (GOMES et al., 2002).

O uso de silagem de planta inteira de milho é bem estabelecido, contudo o uso de silagem de grãos de milho visando aumentar o desempenho animal vem aumentando no cenário atual. A maior digestibilidade do amido do grão ensilado em comparação à grãos secos levou os confinamentos a adotar em silagens de grãos de milho reconstituído (Benton, Klopfenstein e Erickson, 2005). Silagem de espigas, grãos úmidos e grãos reconstituídos são exemplos de alimentos conservados de milho que estão sendo utilizados nos sistemas de produção (Daniel et al. 2019).

2.2 Grãos de milho reconstituídos

No Brasil, a tecnologia de silagem de grãos começou na década de 1980, com alguns agricultores que usavam alta umidade em silagens de grãos de milho para a alimentação de suínos e gado leiteiro. Atualmente, os grãos ensilados aumentaram significativamente por ser um método de processamento eficaz para melhorar seu valor nutritivo e a eficiência alimentar em bovinos de corte e leite (Daniel et al. 2019).

Na reconstituição do grão de milho ocorre a reidratação do grão de milho seco moído que, quando ensilado, as prolaminas que envolvem os grânulos do amido são degradadas durante o processo de fermentação. Além da melhor digestibilidade do amido, optar pela

reconstituição de grãos de milho possibilita ao produtor um maior rendimento com a inclusão de água, armazenamento do grão na própria fazenda com infraestrutura simples e de baixo custo, também permite a compra do milho na safra, quando o preço está em baixa.

Tratando-se de um alimento altamente fermentável, com uma produção elevada de ácido láctico, a silagem de grão reconstituídos torna-se favorável ao processo de deterioração aeróbia. De modo geral, este processo acarreta em aumento do pH e da temperatura, favorecendo o crescimento de microrganismos indesejáveis e conseqüentemente perdas de matéria seca e redução do valor nutricional do material ensilado, interferindo na eficiência alimentar do animal. A alimentação é um dos fatores mais importantes a serem considerados dentro do sistema de produção, visto que o desempenho animal está diretamente relacionado com o consumo da dieta, além de contribuir significativamente nos custos de produção (AGUIAR et al., 2013), salientando a importância de fornecer uma silagem de qualidade aos animais.

2.3 Deterioração aeróbia e microrganismos indesejáveis na silagem

A planta de milho contém grande quantidade de carboidratos solúveis, que são substratos para bactérias do ácido láctico, quando ocorre alta produção desse ácido a silagem se torna muito instável durante o desabastecimento do silo, pois este serve de substrato para microrganismos deterioradores, apresentando assim uma estabilidade baixa (30-40 horas) quando em contato com o oxigênio (BERNARDES et al., 2012). A estabilidade pode ser conceituada como a resistência da massa de forragem à deterioração após a abertura do silo e a deterioração aeróbia das silagens pode ser definida como o somatório da temperatura acumulada, em °C, a partir do momento em que houve a quebra da estabilidade das silagens (CONAGHAN et al., 2010).

Durante o processo de deterioração, leveduras, fungos filamentosos e diversos microrganismos podem desenvolver, afetando diretamente o valor nutricional da silagem. Esse processo ocorre devido ao uso dos produtos finais da fermentação da silagem, como o ácido láctico, e carboidratos como substratos para o crescimento de microrganismos na presença do oxigênio quando o silo é aberto (PAHLOW, et al., 2003).

A aeração da massa na ensilagem, devido ao tempo prolongado em contato com O₂, promove a multiplicação de leveduras, o que eleva a susceptibilidade da silagem em sofrer deterioração após a abertura do silo (McDONALD et al. 1991). As leveduras que assimilam lactato (*Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* e *Pichia* spp.) são geralmente a causa inicial

da deterioração aeróbica das silagens (PAHLOW, et al., 2003), onde são capazes de desenvolver-se em condições de baixa oxigenação (anaeróbios facultativos) e pH menor que 4,0 (McDONALD et al. 1991).

Os fungos filamentosos podem ser considerados coadjuvantes na deterioração aeróbia de silagens, pois, durante o desabastecimento do silo, o desenvolvimento deles acontece em sucessão ao crescimento das leveduras (McDONALD et al., 1991). Estes microrganismos são aeróbios obrigatórios e podem produzir micotoxinas em condições de estresse, como produto orgânico secundário, essas micotoxinas são tóxicas ao animal e ao ser humano.

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

2.4 Inoculantes bacterianos

Aditivos são adicionados durante a confecção da silagem e podem ser classificados como estimulantes de fermentação, inibidores da fermentação, inibidores da deterioração aeróbia e os nutrientes e absorventes, a cultura ensilada que vai determinar qual será utilizado (JUNGES, 2010). Dentro dos inibidores de deterioração aeróbia estão os inoculantes bacterianos, onde as cepas de bactérias ácido lácticas presentes neles são classificadas de acordo com o seu metabolismo. As homofermentativas que convertem glicose em ácido láctico e as heterofermentativas que além do ácido láctico, também produzem ácido acético, etanol e CO₂, além disso, uma das diferenças é que as homoláticas possuem a enzima aldolase e as heterofermentativas a enzima fosfoquetolase e possuem duas vias metabólicas, pela glicólise ou pela via das pentoses (Figura 1).

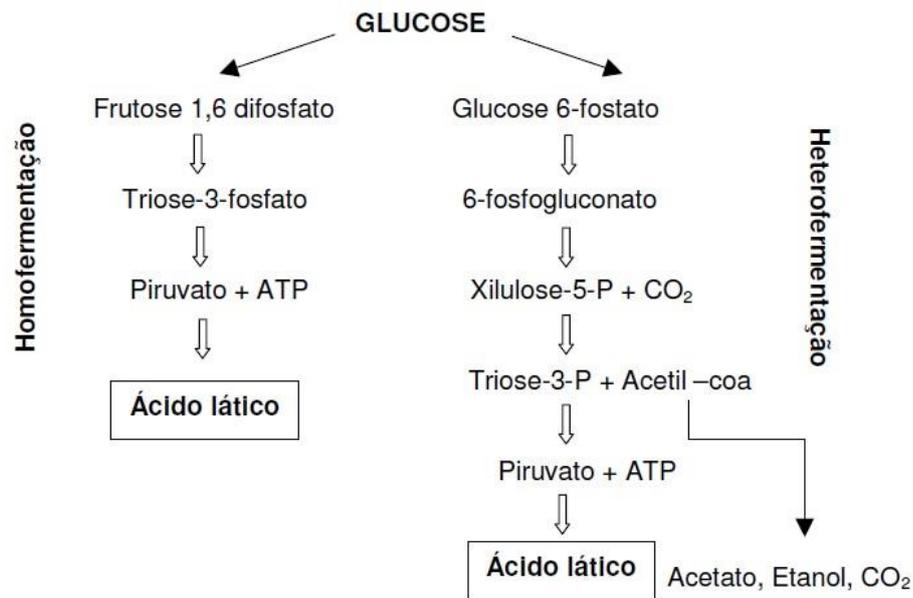


Figura 1 – Representação resumida da fermentação de glicose em bactérias homoláticas e heteroláticas (LEHNINGER et al., 2000).

As bactérias heterofermentativas atuam na inibição da deterioração aeróbia por terem como produto final ácidos orgânicos fracos, principalmente o ácido acético, que atuam como antifúngico. Segundo a “teoria clássica da inibição dos ácidos orgânicos”, as moléculas de ácido não dissociado são lipofílicas e passam facilmente através da membrana plasmática por difusão; no citoplasma, com o pH próximo a 7 (McDONALD et al., 1991).

Por estarem desprotonadas depois que entram da célula, não podem atravessar a bicamada lipídica e se acumulam no citoplasma, diminuindo assim o pH interno, acidificando e inibindo o metabolismo, em particular, as enzimas da glicólise (SALMOND et al., 1984) (Figura 2).

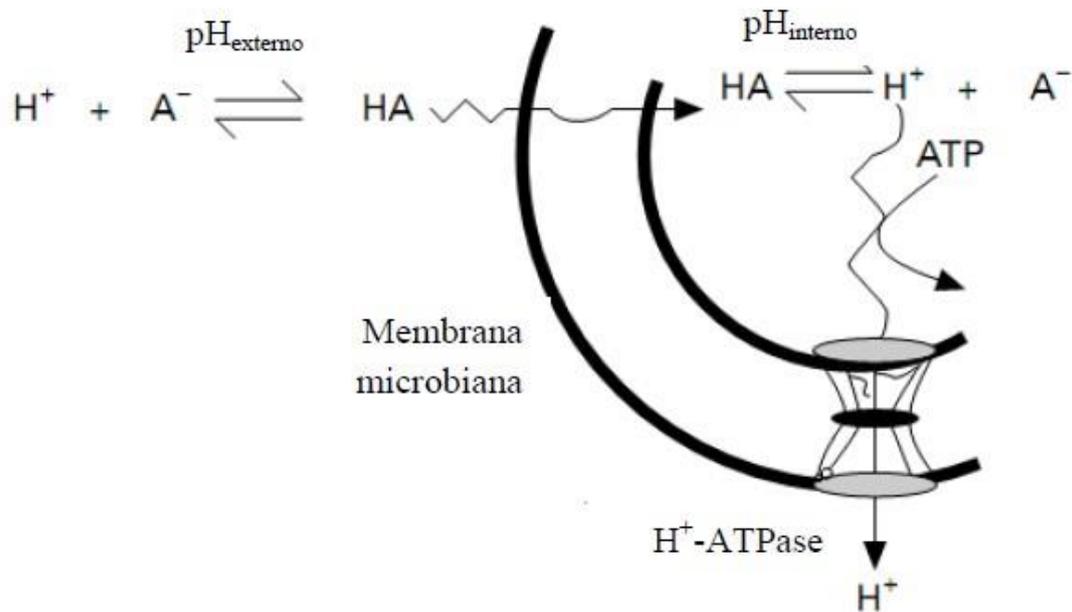


Figura 2 – Mecanismo de ação de ácidos fracos na forma não dissociada na célula microbiana. Adaptado de: Lambert e Stranford, 1999.

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são as principais cepas utilizadas em inoculantes para silagem. As bactérias *L. plantarum* e *L. rhamnosus* são espécies pertencentes ao grupo das homofermentativas, o qual converte um mol de carboidrato em dois moles de ácido lático e energia, utilizadas com a finalidade de aumentar a eficiência fermentativa da silagem.

A inoculação de silagens com o *Lactobacillus buchneri* pode acarretar na redução das concentrações de ácido lático, ao mesmo tempo em que os teores de ácido acético e 1,2propanodiol na silagem aumentam (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999; NISHINO et al., 2003). A *L. buchneri* pela via de fermentação anaeróbia, converte 1 mol de ácido lático em 1 mol de ácido acético, 1 mol de 1,2-propanodiol, CO_2 e traços de etanol (Figura 3).

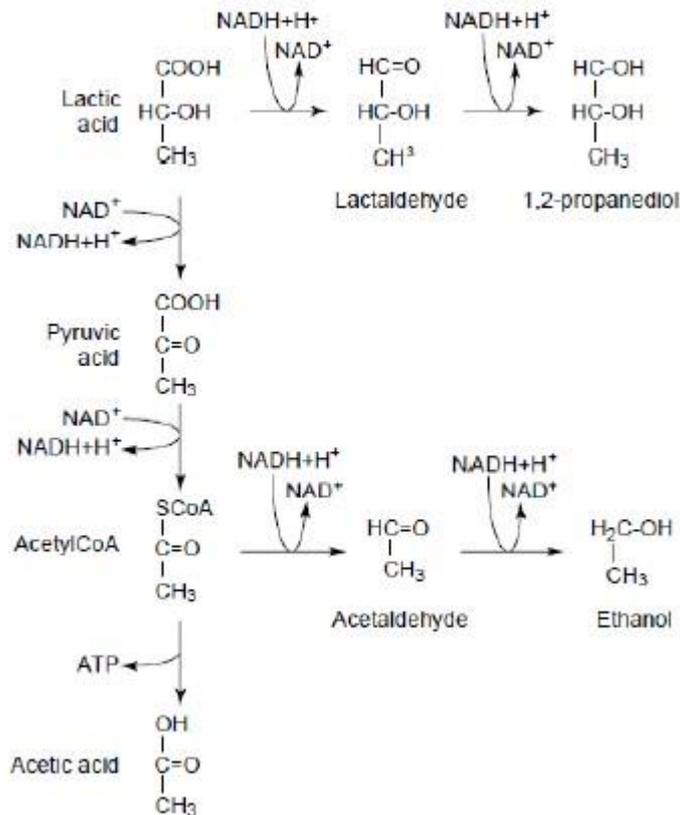


Figura 3 - Degradação anaeróbica do ácido láctico para ácido acético e 1,2-propanodiol por *Lactobacillus buchneri* (OUDE ELFERINK et al., 2001).

O 1-2 propanodiol é um composto orgânico que não interfere na estabilidade da silagem, mas pode se acumular na silagem, pois a *L. buchneri* não consegue degradá-lo. Esse álcool pode ser convertido pela *L. diolivorans* em ácido propiônico (Figura 4), as *L. diolivorans* suportam o pH mais baixo das silagens diferente das bactérias produtoras de ácido propiônico. O ácido propiônico, por sua vez, possui uma maior atividade antifúngica entre os ácidos graxos de cadeia curta e seu efeito é melhorado à medida que o pH aumenta, tornando um ácido eficaz no controle dos microrganismos (WOOLFORD, 1975).

O ácido propiônico é um composto que apresenta características antifúngicas similares, porém mais eficiente, ao ácido acético. Além da redução do pH no interior da célula, sua maior capacidade em controlar os microrganismos deterioradores também está associado à inibição do transporte de aminoácidos através das vesículas das membranas das células, os quais são mais tóxicos que os ácidos (FREESE et al., 1973; MOON, 1983). O ácido acético e propiônico podem ter efeito sinérgico, com o mecanismo de ação na forma não dissociada na célula microbiana, reduzindo o pH interior da célula (McDONALD et al., 1991).

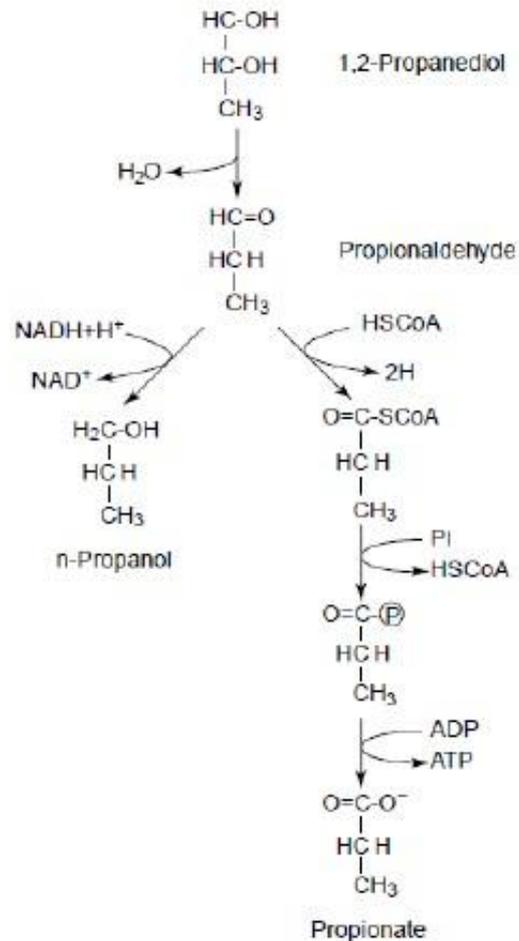


Figura 4 - Degradação anaeróbia do 1,2-propanodiol a ácido propiônico e 1-propanol pela *Lactobacillus diolivorans* (KROONEMAN et al., 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo das silagens e tratamentos

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia na Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil (21°13'49" S, 44°58'10" W). O grão de milho foi obtido comercialmente, com teor de umidade de 10% e foi moído em peneira de 5 mm. A silagem foi

confeccionada em Julho de 2019 no Setor de Forragicultura, apresentando área coberta e longe de qualquer fonte de contaminação.

Os tratamentos incluíram silagem de grão de milho reconstituído sem aditivo (CONTROL), silagem de grão de milho reconstituído inoculada com cepas de bactérias *L. plantarum* DSM 12837, *L. buchneri* DSM 12856 e *L. rhamnosus* NCIMB 30121 (LP+LB), e silagem de grão de milho reconstituído inoculada com cepas de bactérias *L. rhamnosus* NCIMB 30121, *L. buchneri* DSM 12856 e *L. diolivorans* DSM 32074 em duas dosagens: normal (LB+LD) e dosagem dupla (2LB+2LD). As silagens confeccionadas permaneceram estocadas durante 60 dias.

A aplicação dos inoculantes foi realizada logo após a moagem do milho, antes da compactação das silagens. A dosagem aplicada foi de $2,5 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ de massa de milho moído para os tratamentos CONTROL, LP+LB e LB+LD, para o tratamento 2LB+2LD a dosagem foi de $5,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ de massa verde, onde foi realizada uma pré-diluição do produto adicionando 600 ml de água em 100 g de inoculante. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 0,24 ml do inoculante pré-diluído para os tratamentos CONTROL, LP+LB e LB+LD e, 0,48 ml para o tratamento 2LB+2LD, adicionados em 16 litros de água e aplicados no milho moído, alcançando um teor de umidade de 66%.

Foram utilizados 40 kg de milho por tratamento e a aplicação do inoculante foi realizada por irrigação manual, juntamente com a reidratação, seguida da homogeneização do material. Para a reidratação foi utilizada a relação de 400 litros de água para cada tonelada de massa verde. Realizou-se duas coletas de cada tratamento antes dos grãos de milho serem compactados para posterior análise.

Após a aplicação dos tratamentos, foi compactado, em média, $5,353 \pm 0,117$ kg.m⁻³ de milho moído em silos experimentais com capacidade de 5 litros, alcançando uma densidade média de $1.000 \pm 6,80$ kg.m⁻³. Foram preparadas sete repetições para cada tratamento. A compactação foi realizada de forma manual e os silos experimentais foram vedados com tampa e silicone e, por fim, pesados. Passados os 60 dias de estocagem, os silos foram pesados e abertos. A camada superficial com sinais de deterioração de cada unidade experimental foi completamente removida e descartada e a silagem de grão de milho reconstituído remanescente foi retirada e homogeneizada.

Determinados em duplicadas as amostras coletadas foram analisadas quanto as concentrações de MS, pH, produtos finais da fermentação e contagem de microrganismos. Posteriormente a silagem foi submetida a um teste de estabilidade e deterioração aeróbia,

utilizando 3 kg de silagem para cada unidade experimental, expostas ao ar durante 10 dias, em temperatura ambiente (24,5 °C), utilizando caixas de isopor, com dimensões de 25,5 cm x17,5 cm.

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

3.2 Análises e preparo das amostras

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

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

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

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

A contagem de microrganismos (fungos filamentosos, leveduras e bactérias lácticas) foi realizado a partir do extrato aquoso obtido pela homogeneização de 30 g de amostra com 270 ml de água peptonada, agitada em um aparelho homogeneizador (Stomacher 400, Seward, London, UK) por 4 minutos, a 200 rpm. Foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície para contagem dos microrganismos. Como meio de cultura para a contagem de fungos filamentosos e leveduras foi utilizado o meio YGC Agar (Fluka, Sigma Aldrich Química Brasil LTDA) e foram preparadas diluições em séries de 10^{-1} a 10^{-4} em duplicata (TABACCO et al., 2009). As placas permaneceram em uma câmara de germinação, a 28 °C, durante três e cinco dias para as contagens de leveduras e fungos filamentosos, respectivamente.

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

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

3.3 Análise estatística

Os dados de contagem de microrganismos foram transformados em \log_{10} . O delineamento experimental foi inteiramente casualizados, com quatro tratamentos e sete repetições, totalizando 28 unidades experimentais. Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do programa estatístico SAS. As médias dos tratamentos foram estimadas pelo

“LSMEANS” e a comparação foi realizada pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Sendo,

Y_{ij} = valor da variável referente à repetição que recebeu o tratamento i ;

μ = média geral;

T_i = efeito fixo do tratamento i , para $i = 1, 2, 3$; e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação Y_{ij}

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de MS, pH, contagem de microrganismos e produtos finais da fermentação estão apresentados na Tabela 1. No momento da abertura do silo, o teor de MS das silagens teve média de 64,25% e observou-se que a adição de inoculantes no momento da ensilagem não afetou o teor de matéria seca ($P = 0,8876$).

Verificou-se que o pH das silagens 2LP+2LD foi maior que a demais silagens ($P = <0,0001$). A presença de bactérias heterofermentativas obrigatórias (*L. buchneri*) na composição do inoculante em dosagem dupla possivelmente contribuiu com maiores valores de pH nessas silagens. A produção de ácido acético por essas bactérias está relacionada com a via de fermentação anaeróbia do ácido lático como substrato, e não necessariamente com a via das pentoses (OUDE ELFERINK et al., 2001; MUCK et al., 2018). Logo, o maior pH dessas silagens está relacionado com o consumo de ácido lático durante o processo de fermentação.

Na contagem de leveduras houve diferença ($P = <0,0001$) entre as silagens, com uma menor contagem desses microrganismos nas silagens 2LB+2LD, aproximadamente 3 vezes inferior às demais silagens. A adição de BAL heterofermentativas presentes na composição dos inoculantes possivelmente auxiliou no controle do crescimento das leveduras. O ácido acético apresenta características antimicrobianas que são capazes de controlar o crescimento de microrganismos capazes de deteriorar a silagem, como é o caso das leveduras e dos fungos

filamentosos (DAVISON, 1997). Nas silagens que receberam a dosagem dupla (2LB+2LD), observou-se que a concentração de ácido acético foi 2,4 vezes maior que as demais silagens. Em relação à contagem de fungos filamentosos, não foi possível observar nenhuma diferença entre as silagens ($P = 0,0910$).

Tabela 1 – Valores de MS, pH, contagem de microrganismos e produtos finais da fermentação de silagens de grãos de milho reconstituídos e tratados com inoculantes.

Variáveis	Tratamentos				EPM ⁵	P-value
	CONTROL ¹	LP+LB ²	LB+LD ³	2LB+2LD ⁴		
Matéria seca (%)	64,2	65,2	64,4	64,4	0,9948	0,8876
pH	3,81 b	3,78 b	3,80 b	3,87 a	0,0101	<0,0001
Leveduras (log UFC.g ⁻¹)	3,06 a	2,95 a	3,13 a	1,04 b	0,1296	<0,0001
F. filamentosos (log UFC.g ⁻¹)	<2	<2	2,09	<2	0,1734	0,0910
BAL ⁶ (log UFC.g ⁻¹)	5,16 d	5,91 c	6,67 b	7,52 a	0,1576	<0,0001
Ácido Lático (% MS)	4,71 bc	5,15 a	5,07 ab	4,59 c	0,0943	0,0010
Ácido Acético (% MS)	0,66 c	0,75 bc	0,97 b	1,94	0,0583	<0,0001
Ácido Propiônico (% MS)	0,02 b	0,02 b	0,02 b	0,09 a	0,0042	<0,0001
Etanol (% MS)	1,30 d	2,45 b	2,06 c	3,19 a	0,0876	<0,0001
1,2-propanodiol (% MS)	0,01 b	0,01 b	0,17 a	0,08 b	0,0208	0,0001

¹ Silagem sem inoculantes; ²Silagem inoculada com *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. buchneri*; ³Silagem inoculada com *L. rhamnosus*, *L. buchneri* e *L. diolivorans*; ⁴Silagem inoculada com dosagem dupla de *L. rhamnosus*, *L. buchneri* e *L. diolivorans*; ⁵Erro padrão da média. ⁶Bactérias ácido láticas; Letras iguais seguidas na mesma linha não diferem entre si ($P > 0,05$).

Houve diferença na contagem de BAL ($P = <0,0001$) entre as silagens. As silagens 2LB+2LD tiveram maior contagem ($7,52 \log \text{UFC.g}^{-1}$) enquanto a menor contagem desses microrganismos ocorreu nas silagens CONTROL ($5,16 \log \text{UFC.g}^{-1}$). O uso de inoculantes bacterianos na ensilagem aumentou o aporte de BAL na silagem.

A atividade metabólica das BAL influencia diretamente na concentração dos produtos finais da fermentação. A concentração de ácido láctico das silagens apresentou diferença significativa ($P = 0,0010$). As silagens LP+LB e LB+LD tiveram maiores concentrações de ácido láctico, contudo, as silagens LB+LD não diferiram das silagens CONTROL. Estas, por sua vez, não diferiram das silagens 2LB+2LD, as quais tiveram menores concentração de ácido láctico.

As maiores concentrações do ácido láctico foram em silagens inoculadas, devido ao aumento da população de BAL, principalmente pelas BAL homofermentativas que convertem glicose em ácido láctico. A concentração de ácido láctico nas silagens 2LB+2LD não diferiram das silagens CONTROL. Isso provavelmente deve-se ao fato de que, a maior população de cepas *L. buchneri* presentes na composição do inoculante aumentou o uso do ácido láctico por essas bactérias como substratos para o seu metabolismo.

Em relação à concentração de ácido acético, observou-se que foi maior ($P < 0,0001$) nas silagens 2LB+2LD. As silagens LB+LD e LP+LB, por sua vez, tiveram concentrações iguais de ácido acético, enquanto que as silagens LP+LB também não diferiram das silagens CONTROL. A inoculação de bactérias heterofermentativas em dosagem dupla explica essa maior concentração de ácido acético no 2LB+2LD, uma vez que houve maior contagem de BAL nessas silagens, principalmente a *L. Buchneri*.

As bactérias *L. diolivorans* tem como única e exclusiva função a conversão do 1,2propanodiol em 1-propanol e ácido propiônico, um ácido fraco capaz de auxiliar na estabilidade aeróbia das silagens (KROONEMAN et al., 2002; FILYA, et al. 2004). A concentração de ácido propiônico foi maior no 2LB+2LD ($P < 0,0001$), enquanto que a concentração de 1,2propanodiol foi maior em LB+LD ($P = 0,0001$).

A concentração de etanol foi maior para 2LB+2LD e menor em LB+LD ($P < 0,0001$). Um dos produtos finais da fermentação de cepas *L. buchneri*, quando consomem carboidratos e ácido láctico, é a formação de traços de etanol. Logo, a maior concentração deste álcool nas silagens 2LB+2LD provavelmente deve-se pela maior contagem de BAL nessas silagens.

Os resultados referentes às perdas de matéria seca, deterioração aeróbia e estabilidade aeróbia das silagens estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Perdas na matéria seca, deterioração aeróbia, e estabilidade aeróbia de silagens de grãos de milho reconstituídos tratadas com inoculantes.

Variáveis	Tratamento				EPM ⁵	P-value	
	CONTROL ¹	LP+LB ²	LB+LD ³	2LB+2LD ⁴			
PMS ⁶ (% MS)	6,91 a	7,45 a	4,92 a	1,25 b	0,8681	0,0001	
Estabilidade (h)	60,6 b	52,1 b	73,3 b	168,5 a	13,8249	<0,0001	
Deterioração (°C)	14,5 a	20,42 a		12,57 a	1,85 b	2,6274	0,0004

¹Silagem sem inoculantes; ²Silagem inoculada com *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. buchneri*; ³Silagem inoculada com *L. rhamnosus*, *L. buchneri* e *L. diolivorans*; ⁴Silagem inoculada com dosagem dupla de *L. rhamnosus*, *L. buchneri* e *L. diolivorans*; ⁵Erro padrão da média; ⁶Perda de matéria seca. Letras iguais seguidas na mesma linha não diferem entre si ($P > 0,05$).

As PMS das silagens na deterioração aeróbia foram menores nas silagens 2LB+2LD ($P = 0,0001$), promovendo uma redução de, em média, 5,18% de PMS em relação às demais silagens. As perdas de MS na estabilidade ocorrem devido a atividade metabólicas dos microrganismos deterioradores. As silagens 2LB+2LD tiveram maior concentração de ácido acético, que como já mencionado anteriormente, possui características antifúngicas e atuam no controle de fungos filamentosos e leveduras, microrganismos que estão diretamente relacionados com a perda de MS.

As silagens 2LB+2LD tiveram maior estabilidade aeróbia, em relação às demais silagens. Estas tiveram, aproximadamente, um acréscimo de 113 horas de estabilidade aeróbia em relação às demais silagens. A presença de ácidos fracos com características antifúngicas (e.g. ácido acético e ácido propiônico), advindos de BAL heterofermentativas inoculadas, permitem melhorias na estabilidade aeróbia de silagens.

O ácido acético e propiônico podem ter efeito sinérgico, contudo a concentração de ácido propiônico nas silagens 2LB+2LD são muito baixas, silagens possuem de 0,6 a 1%, o que torna difícil sugerir que a maior estabilidade aeróbia dessas silagens foi em função do possível efeito sinérgico entre os ácidos ou apenas da maior concentração de ácido acético.

As silagens CONTROL, LP+LB e LB+LD tiveram maiores acúmulos de temperatura em relação às silagens 2LB+2LD ($P = 0,0004$). A temperatura da silagem pode ser utilizada como um índice de avaliação da atividade metabólica de leveduras (BORREANI; TABACCO,

2010) e, o aumento da temperatura pode ser controlado a partir da inibição da ação dos microrganismos deterioradores. Logo, a maior concentração de ácidos fracos (acético e propiônico) nas silagens 2LB+2LD inibiram a ação destes microrganismos deterioradores durante a exposição destas silagens ao oxigênio atmosférico.

No figura 5, o gráfico ilustra a evolução da temperatura das silagens, conseqüentemente a perda da estabilidade e o processo de deterioração aeróbia.

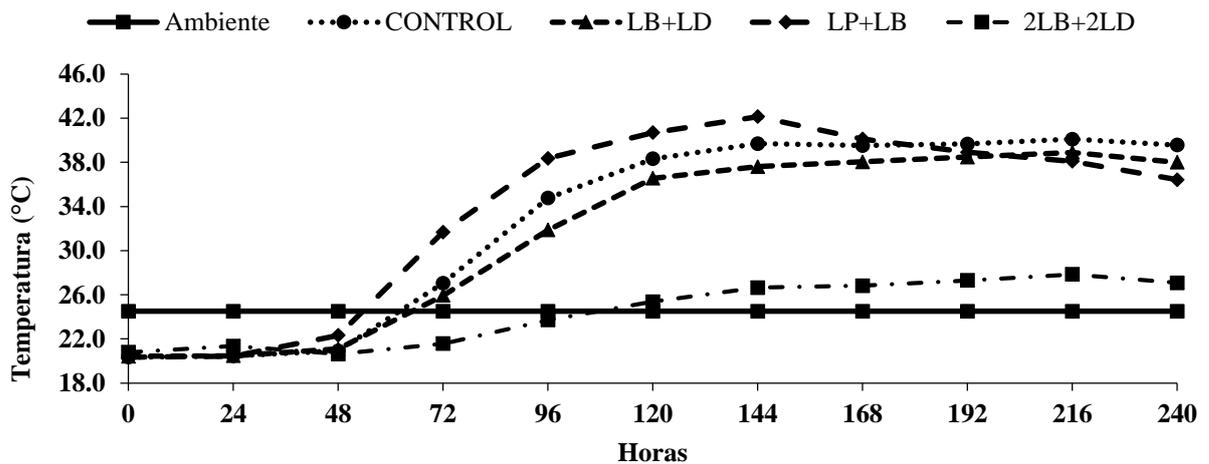


Figura 5 – Gráfico de estabilidade e processo de deterioração aeróbia de silagens de grãos reconstituídos de milho estocados por 60 dias.

5 CONCLUSÃO

O uso de inoculante bacteriano com associação de *L. buchneri* e *L. diolivorans* em silagens de grãos de milho reconstituídos estocados por 60 dias foi efetivo, de forma mais expressiva, quando se trabalhou com a dosagem dupla. As silagens com dosagem dupla expressaram um melhor perfil de fermentação, bem como melhores respostas na estabilidade aeróbia e menor atividade metabólicas dos microrganismos deterioradores. Além disso, a produção de ácido propiônico foi maior apenas quando usou a dosagem dupla nas silagens, ainda que em concentrações relativamente baixas.

6 IMPLICAÇÕES

Silagens de grãos reconstituídos de milho são alimentos que apresentam baixa estabilidade aeróbia, requerendo maiores tempos de estocagem (e.g. 90 dias). No entanto, nesse estudo foi possível observar que a inoculação entre a associação de diferentes cepas de BAL com a concomitante produção de diferentes ácidos orgânicos com características antifúngicas (ácido acético e ácido propiônico), melhorou a estabilidade aeróbia de silagens de grãos de milho reconstituídos estocadas por 60 dias. Logo, em condições práticas, é possível garantir maior estabilidade aeróbia dessas silagens, especialmente em situações adversas na propriedade em que ocorra a necessidade de abrir um silo com menor tempo de estocagem (e.g. 60 dias) sem afetar a digestibilidade do grão.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. C. R. et al. Consumo, produção e composição do leite e do queijo de vacas leiteiras com níveis crescentes de ureia. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 20, n. 1, p. 37-42, 2013.
- BENTON, Joshua R.; KLOPFENSTEIN, Terry J.; ERICKSON, Galen E. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. 2005.
- BERNARDES, T. F.; DO RÊGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1852-1861, 2014.
- BERNARDES, T.F. et al. Top spoilage losses in maize silage sealed with plastic films with different permeabilities to oxygen. **Grass and Forage Science**, v. 67, n. 1, p. 34-42, 2012.
- BERNARDES, Thiago Fernandes. Controle da deterioração aeróbia de silagens. **Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, 2006.
- BORREANI, G.; TABACCO, E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**. Champagn, v. 93, n. 6, p. 2620-2629, 2010.
- CONAGHAN, Philip; O'KIELY, P.; O'MARA, F. P. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 2, p. 628-643, 2010.

- DANIEL, J. L. P. et al. Alterações na qualidade de silagens de milho durante o armazenamento. In: JOBIM, C. C.; CECATO, U.; CANTO, M. W.; BANKUTI, F. I. (eds.). SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 5., 2014. Maringá, **Anais...** Maringá, 2014. p. 23-36.
- DANIEL, João Luiz Pratti et al. Production and utilization of silages in tropical areas with focus on Brazil. **Grass and Forage Science**, v. 74, n. 2, p. 188-200, 2019.
- DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTIVELLE, T. J. (Ed). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 520-556.
- DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeasts growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**. v. 87, n. 4, p. 583-594, 1999.
- FILYA, I. The effect of *Propionicbacterium acidipropionic*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied and Microbiology**. v. 97, n. 4, p. 818-826, 2004.
- GOMES, M. S. et al. Avaliação de cultivares de milho para a produção de silagem: parâmetros genéticos e interação genótipos por ambientes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2002, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2002.
- HALL, M. B.; MERTENS, D. R. Technical note: effect of sample Processing procedures on measurement of starch in corn silage and corn grain. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 91, n.12, p. 4830-4833, 2008.
- JUNGES, D. (2010). Aditivo microbiano na silagem de milho em diferentes tempos de armazenamento e avaliação da estabilidade aeróbia por termografia em infravermelho.
- KROONEMAN, J. et al. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterial isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 639-646, 2002.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. Sao Paulo: Sarvier, 2000.
- 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.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. The biochemistry of silage 2nd ed. **Marlow, UK: Chalcombe Publications**, 1991.
- MELLO, R., NÖRNBERG, J. L., DA ROCHA, M. G., & DE DAVID, D. B. (2010). Características produtivas e qualitativas de híbridos de milho para produção de silagem. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 4(01).

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

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

PAHLOW, Günter et al. Microbiology of ensiling. **Agronomy**, v. 42, p. 31-94, 2003.

PITT, John I. et al. Fungi and food spoilage. New York: Springer, 2009.

SALMOND, Christine V.; KROLL, Rohan G.; BOOTH, Ian R. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *Microbiology*, v. 130, n. 11, p. 2845-2850, 1984.

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

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

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

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