



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE UREIA E *LACTOBACILLUS BUCHNERI* EM
SILAGENS DE MILHO**

ANA PAULA MAIA DOS SANTOS

AREIA - PB
FEVEREIRO, 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE UREIA E *LACTOBACILLUS BUCHNERI* EM
SILAGENS DE MILHO**

ANA PAULA MAIA DOS SANTOS

Zootecnista

AREIA - PB
FEVEREIRO, 2018

ANA PAULA MAIA DOS SANTOS

**EFEITO DA ADIÇÃO DE UREIA E *LACTOBACILLUS BUCHNERI*
EM SILAGENS DE MILHO**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Forragicultura

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Edson Mauro Santos – Orientador Principal

Prof. Dr. Gleidson Giordano Pinto de Carvalho

Prof. Dr. Gherman Garcia Leal de Araújo

**AREIA - PB
FEVEREIRO, 2018**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237e Santos, Ana Paula Maia Dos.

EFEITO DA ADIÇÃO DE UREIA E LACTOBACILLUS BUCHNERI
EM
SILAGENS DE MILHO / Ana Paula Maia Dos Santos. -
Areia, 2018. 133
f. : il.

Orientação: Edson Mauro Santos.
Coorientação: Gherman Garcia Leal Araújo, Gleidson
Giordano Pinto Carvalho.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Aditivo Biológico. 2. Bactéria Láctica. 3.
Aditivo
Químico. 4. Ensilagem. I. Santos, Edson Mauro. II.
Araújo, Gherman Garcia Leal. III. Carvalho, Gleidson
Giordano Pinto. IV. Título.

UFPB/CCA-AREIA

Elaborado por - CRB-



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: “Efeitos da adição de ureia e *Lactobacillus buchneri* em silagens de milho”

AUTOR: Ana Paula Maia dos Santos

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Mauro Santos

JULGAMENTO

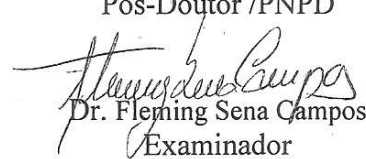
CONCEITO: APROVADO

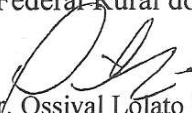
EXAMINADORES:

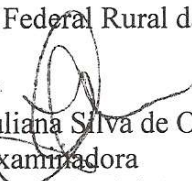

Prof. Dr. Edson Mauro Santos
Presidente

Universidade Federal da Paraíba


Dr. Alexandre Fernandes Perazzo
Examinador
Pós-Doutor /PNPD


Dr. Fleming Sena Campos
Examinador
Universidade Federal Rural do Pernambuco


Prof. Dr. Ossival Lolato Ribeiro
Examinador
Universidade Federal Rural da Bahia


Profª. Dra. Juliana Silva de Oliveira
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba

Areia, 28 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA PAULA MAIA DOS SANTOS - Filha de José Eune dos Santos e Sônia Maria Maia dos Santos, nasceu em 11 de dezembro de 1986, na cidade de Pão de Açúcar, Estado de Alagoas. Ingressou no curso de Zootecnia em 2005. Quando acadêmica do curso de Zootecnia, participou e organizou eventos da área. Foi bolsista de iniciação científica (PIBIC/FAPEAL) durante 24 meses, desenvolvendo pesquisas na área de Forragicultura e Nutrição Animal. Em dezembro de 2011, graduou-se em Zootecnia pela Universidade Estadual de Alagoas. Em fevereiro de 2012, ingressou no Mestrado em Zootecnia do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, no qual foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), desenvolvendo sua pesquisa na área de Forragicultura. Após a finalização do Mestrado, ingressou em 2014, no Doutorado em Zootecnia do Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, na área de Forragicultura. Aprovada em 2015, em Concurso Público para Docente na Universidade Estadual de Alagoas (UNEAL), na qual atua como Docente Assistente no Curso de Zootecnia desde 2016. Submete-se à defesa de Tese de Doutorado no dia 28 de fevereiro de 2018.

*Conheça todas as teorias,
domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana,
seja apenas outra alma humana.*

(Carl Gustav Jung)

À minha família.

Aos amigos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Ser Supremo, razão de toda a existência.

Aos meus Pais, José Eune dos Santos e Sônia Maria Maia dos Santos, irmãos e demais familiares, por acreditarem no meu crescimento profissional e pessoal e me apoiarem, mesmo à distância.

Ao meu orientador e amigo Edson Mauro Santos, que me conduziu com ética, competência, humanidade e retidão até o dia de hoje. Certamente guardarei vossos ensinamentos e vossa valiosa amizade por toda a vida. És a inspiração profissional que desejo atingir.

Aos coorientadores Dr. Gleidson Giordano Pinto de Carvalho e Dr. Gherman Garcia Leal de Araújo, pelas colaborações neste trabalho.

À Banca Examinadora, composta pela Dra. Juliana Silva de Oliveira, Dr. Alexandre Fernandes Perazzo, Dr. Fleming Sena Campos e Dr. Ossival Lolato Ribeiro, por vossas contribuições neste trabalho e também em minha vida acadêmica.

Aos docentes do Programa Doutorado Integrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, por me proporcionarem ambiente de aprendizado e amadurecimento profissional.

À todos os funcionários da UFPB, na pessoa de Dona Carmen, que todos os dias contribuem com seus trabalhos.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, pela oportunidade de realização do Doutorado.

À Universidade Federal de Viçosa, na pessoa do Professor Dr. Odilon Gomes Pereira, assim como a toda sua equipe, por propiciar a realização de parte de análise microbiológica da pesquisa experimental.

Ao Grupo de Estudos em Forragicultura (GEF) e seus integrantes, Higor Fábio, Gildênia Pereira, Joyce Silva, Rosângela Claurênia, Alberto Azevedo, Samiramys Silva, Maria Leonor, Alexandre Perazzo, Wilma Cristina, Leydiane, Eriane, Vinícius Silva, Priscila, Ricardo Pinho, Ana Paula Gomes, Thiago Silva, Ana Caroline, Nivaldo Barros, Messias Nogueira, Nagnaldo Tavares, Sansão de Paula, Felipe, Thomaz, pessoas a quem prezo afeto e admiração, que constituíram minha família no Estado da Paraíba.

Em especial, aos colegas e amigos da UFPB e UFV que contribuíram positivamente para o meu crescimento profissional e pessoal: Fernanda Parizio, Talma Jordana, Mauro, Tiago Santos, Juliete, Ana Jaqueline, Candice de León, Flávio Soares, Flávio Gomes, Alexandre, Karla Priscila, Juraci Marcos, Iana Mara, Carla, Rosinéia, João Paulo Roseira, Tâmara, Filipe e Jaína.

Aos amigos Michel Azevedo, Yedda Oliveira e Guilherme Costa, por todo carinho e incentivo nesta trajetória.

À Capes, pelo financiamento de bolsa de estudos durante período do Doutorado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com a concretização deste momento ímpar, para o profissional e o pessoal.

Gratidão.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Figuras.....	xiv
Resumo Geral.....	xvii
Abstract.....	Xviii
 Considerações Iniciais.....	 1
 Capítulo I – Efeito da Adição de Ureia e <i>Lactobacillus buchneri</i> em silagens.....	 3
Referencial Teórico.....	4
Referências Bibliográficas.....	19
 Capítulo II – Efeito da Ureia sobre a Fermentação, Composição Bromatológica e Estabilidade Aeróbia de Silagens de Milho.....	 30
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	34
Resultados e Discussão.....	39
Conclusões.....	54
Referências Bibliográficas.....	55
 Capítulo III – Efeito de <i>Lactobacillus buchneri</i> Pré-ativado e Ureia sobre as Perdas, Padrão Fermentativo, Composição Bromatológica e Estabilidade Aeróbia de Silagens de Milho.....	 65
Resumo.....	66
Abstract.....	67
Introdução.....	68
Material e Métodos.....	69

Resultados e Discussão.....	74
Conclusões.....	87
Referências Bibliográficas.....	88
Capítulo IV – Efeito da Inoculação com <i>Lactobacillus buchneri</i>	
Liofilizado e Ativado sobre as Populações de Bactérias	
Láticas de Silagens de Milho.....	96
Resumo.....	97
Abstract.....	98
Introdução.....	99
Material e Métodos.....	100
Resultados e Discussão.....	104
Conclusões.....	109
Referências Bibliográficas.....	110
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	114

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo II – Efeito da Ureia sobre a Fermentação, Composição Bromatológica e Estabilidade Aeróbia de Silagens de Milho	
Tabela 1. Composição química e populações microbianas da planta de milho antes da ensilagem.....	36
Tabela 2. Perfil fermentativo e populações microbianas de silagens de milho aditivadas com doses de ureia.....	40
Tabela 3. Perdas e recuperação de matéria seca de silagens de milho aditivadas em doses de ureia.....	44
Tabela 4. Composição bromatológica de silagens de milho aditivadas com diferentes doses de ureia.....	46
Tabela 5. Coeficientes de correlação de Pearson das características fermentativas, microbiológicas e perdas de silagens de milho..	49
Tabela 6. Valores médios de pH, leveduras, temperatura máxima e estabilidade aeróbia de silagens de milho não tratadas e tratadas com ureia.....	53

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo III – Efeito de <i>Lactobacillus buchneri</i> Pré-ativado e Ureia sobre as Perdas, Padrão Fermentativo, Composição Bromatológica e Estabilidade Aeróbia de Silagens de Milho	
Tabela 1. Composição química e populações microbianas da planta de milho antes da ensilagem.....	72
Tabela 2. Valores médios de concentrações de ácidos orgânicos e etanol em silagens de milho não tratadas ou não com aditivos químico e microbiológico isolados e/ou associados.....	75
Tabela 3. Perdas fermentativas e recuperação de matéria seca de silagens de milho não tratadas e tratadas com ureia e inoculante isolados e/ou associados.....	78
Tabela 4. Valores médios de pH e nitrogênio amoniacal de silagens de milho não tratadas e tratadas com aditivos químico e microbiológico isolados e/ou associados em diferentes períodos de abertura.....	81
Tabela 5. Composição bromatológica de silagens de milho não tratadas e tratadas com aditivo químico e/ou biológico isolados e/ou associados em diferentes períodos de fermentação.....	84
Tabela 6. Valores médios de pH final, populações de leveduras, temperatura máxima e estabilidade aeróbia de silagens de milho não tratadas ou tratadas com ureia e <i>Lactobacillus buchneri</i> isolados e/ou associados.....	85

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo IV – Efeito da Inoculação de <i>Lactobacillus buchneri</i> liofilizado e ativado sobre as populações de bactérias lácticas de silagens de milho	
Tabela 1. Identificação molecular de amostras de bactérias do gênero <i>Lactobacillus</i> isoladas.....	106

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo I – Efeito da Adição de Ureia e <i>Lactobacillus buchneri</i> em silagens	
Figura 1. Populações de <i>L. buchneri</i> em silagens de alfafa durante o processo fermentativo.....	17

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo II – Efeito da Ureia sobre a Fermentação, Composição Bromatológica e Estabilidade Aeróbia de Silagens de Milho	
Figura 1. Distribuição das variáveis experimentais matéria seca (MS), pH, ácido láctico (AL), ácido acético (AA), ácido propiônico (AP), ácido butírico (AB), etanol (ETAN), populações de bactérias ácido lácticas (BAL), populações de leveduras (LEV), perdas de matéria seca (PMS), perdas por gases (PG), perdas por efluentes (PE) e recuperação de matéria seca (RMS) no sistema de coordenadas abrangidas pelos componentes principais 1 e 2.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo IV – Efeito da Inoculação de <i>Lactobacillus buchneri</i> liofilizado e ativado sobre as populações de bactérias lácticas de silagens de milho	
Figura 1. Valores médios de crescimento de bactérias lácticas em silagens de milho <i>in natura</i> e inoculadas com <i>Lactobacillus buchneri</i> durante diferentes períodos de fermentação.....	105
Figura 2. Produtos de ampliação de PCR para lactobacilos.....	108

EFEITO DA ADIÇÃO DE UREIA E *Lactobacillus buchneri* EM SILAGENS DE MILHO

RESUMO GERAL

Objetivou-se, neste estudo, avaliar os efeitos da adição de ureia e inoculante à base de *Lactobacillus buchneri* liofilizado e pré-ativado em leite desnatado reconstituído, testando-se os efeitos dos aditivos isolados e associados, sobre as características fermentativas, composição bromatológica, populações microbianas e estabilidade aeróbia de silagens de milho. Foram realizados 2 ensaios experimentais no Setor de Forragicultura do Centro de Ciências Agrárias, Campus II, da Universidade Federal da Paraíba. No primeiro experimento, os tratamentos avaliados foram os níveis de adição de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de ureia, com base na matéria seca. No segundo experimento, as silagens foram tratadas com inoculante liofilizado sem e com ureia, inoculante ativado sem e com ureia, e 1% de ureia, em diferentes períodos fermentativos (1, 3, 7, 14 e 70 dias). As variáveis fermentativas avaliadas foram: pH, conteúdo de matéria seca, ácidos orgânicos e etanol, perdas de matéria seca, perdas por gases e efluentes, recuperação de matéria seca, composição bromatológica e contagem de populações de bactérias ácido lácticas e leveduras. As silagens foram expostas ao ar durante o período de 96 horas e avaliaram-se valores de pH, populações de leveduras, temperatura máxima atingida pelas silagens e estabilidade aeróbia. Após a contagem de populações de bactérias lácticas das silagens, procedeu-se análise de reação em cadeia da polimerase para identificação das bactérias isoladas. A adição de ureia nas silagens promoveu melhorias no perfil fermentativo, redução de perdas, incremento de nitrogênio na massa ensilada, redução do conteúdo fibroso e aumento da estabilidade aeróbia das silagens de milho. A inoculação das silagens com cepas liofilizadas e pré-ativadas não apresentou resultados expressivos quando realizada isoladamente. A adição de *Lactobacillus buchneri* e ureia na ensilagem de milho afetou o perfil fermentativo, as perdas fermentativas e estabilidade aeróbia, as populações de bactérias ácido lácticas e leveduras e a composição bromatológica das silagens. A estabilidade aeróbia das silagens tratadas com aditivos foi superior àquelas não tratadas. Os resultados da análise de identificação de bactérias lácticas isoladas nas silagens não tratadas e tratadas com inoculante liofilizado e pré-ativado em leite desnatado reconstituído não indicaram a predominância de *Lactobacillus buchneri* nas silagens aditivadas.

Palavras chaves: aditivo biológico; bactéria láctica; ensilagem.

EFFECT OF UREA AND *Lactobacillus buchneri* ADDITION ON THE CORN SILAGE

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of the addition of urea and *Lactobacillus buchneri* lyophilized and activated inoculant in reconstituted skim milk, by testing the effects of the isolated and associated additives on the fermentative characteristics, microbial populations and aerobic stability of corn silages. Two experimental trials were carried out in the Forage Sector of the Center of Agrarian Sciences, Campus II, Federal University of Paraíba. In the first experiment, the treatments evaluated were the addition levels of 0.0; 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0% urea, based on the dry matter. In the second experiment, the silages were treated with lyophilized inoculant without and with urea, inoculant activated without and with urea, and 1% of urea, in different fermentation periods (1, 3, 7, 14 and 70 days). The fermentative variables evaluated were: pH, dry matter content, organic acids and ethanol, dry matter losses, gas and effluent losses, dry matter recovery, bromatological composition and lactic acid bacteria and yeast populations. The silages were exposed to air during the 96 hour period and pH values, yeast populations, maximum temperature reached by silages and aerobic stability were evaluated. After counting populations of lactic acid bacteria from the silages, polymerase chain reaction analysis was performed to identify the isolated bacteria. The addition of urea in the silages promoted improvements in the fermentation profile, reduction of losses, increase of nitrogen in the ensiled mass, reduction of the fibrous content and increase of the aerobic stability of corn silages. The inoculation of silages with lyophilized and activated strains did not present expressive results when carried out alone. The addition of *Lactobacillus buchneri* and urea in maize silage affected the fermentation profile, fermentative losses and aerobic stability, populations of lactic acid bacteria and yeasts and the bromatological composition of the silages. The aerobic stability of the silages treated with additives was higher than those not treated. The results of the analysis of identification of lactic bacteria isolated in the untreated and treated silages with lyophilized inoculant and activated in reconstituted skimmed milk did not indicate the predominance of *Lactobacillus buchneri* in the additive silages.

Keywords: biological additive; lactic acid bacteria; ensilage.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A utilização de silagens tem sido uma eficiente alternativa para a produção animal, proporcionando volumoso de boa qualidade e largamente empregado na alimentação de ruminantes.

A ensilagem é uma técnica de preservação de forragens úmidas a partir da acidificação da massa ensilada através da atividade de bactérias lácticas, que convertem carboidratos solúveis a ácidos orgânicos, principalmente ácido lático.

A qualidade da silagem está diretamente ligada ao processo fermentativo que ocorre no silo. A técnica de ensilagem pode apresentar possíveis riscos de perdas de nutrientes decorrentes da baixa qualidade do processo fermentativo (fermentações indesejáveis). Os principais fatores que podem interferir na fermentação da silagem estão associados às características da forrageira utilizada. Quando estas limitam a qualidade do processo fermentativo, indica-se a utilização de aditivos na ensilagem. Existe uma diversidade de aditivos para ensilagem e diferentes situações de uso.

Há aditivos que estimulam a fermentação, enquanto outros inibem a ação de microrganismos indesejáveis. Ainda, há aditivos que elevam o valor nutritivo do alimento final, aumentam o conteúdo de matéria seca da silagem e melhoram a resistência da massa ensilada quando exposta ao ar.

Um dos principais motivos para o uso de aditivos no processo de ensilagem é a redução do risco de ocorrência de fermentação de baixa qualidade, o que gera perdas consideráveis e decréscimo do valor nutritivo do alimento final.

Outras razões para o uso destas substâncias na ensilagem é o beneficiamento nutritivo resultante do uso do aditivo (exemplo: a adição de ureia na ensilagem de forrageiras com baixa concentração proteica) e a melhoria da estabilidade aeróbia da massa ensilada durante a fase de descarga.

A deterioração aeróbia da silagem é um problema de grande significância para a qualidade dos alimentos e rentabilidade das explorações agrícolas no mundo. Todas as silagens expostas ao ar deterioram, como resultado da atividade microbiana aeróbia. Até mesmo as silagens que apresentam boa fermentação.

A silagem de milho possui adequado perfil fermentativo, entretanto, o alto conteúdo de ácido láctico resultante e o teor de carboidratos solúveis residuais podem promover maior deterioração aeróbia quando na fase de descarga e oferta do alimento aos animais.

Com isso, propusera-se neste trabalho, avaliar os efeitos de dois aditivos comumente utilizados na ensilagem de forrageiras com elevada produção de ácido láctico: a ureia e inoculante à base de cepas de *Lactobacillus buchneri*, de forma isolada ou associada.

No Capítulo I, constituiu-se Revisão de Literatura com objetivo de descrever os efeitos da adição de ureia e *Lactobacillus buchneri* em diferentes silagens, abordando e descrevendo estudos experimentais realizados com a utilização destes aditivos em diferentes tipos de silagens, enfatizando os principais efeitos encontrados.

No Capítulo II, intitulado *Efeito da Ureia sobre a Fermentação, Composição Bromatológica e Estabilidade Aeróbia de Silagens de Milho*, objetivou-se avaliar os efeitos da adição de ureia sobre as características fermentativas, composição bromatológica, populações microbianas e estabilidade aeróbia de silagens de milho.

No Capítulo III, objetivou-se o avaliar os efeitos da aplicação de inoculante previamente ativado e/ou liofilizado, isolado e associado com ureia, sobre as perdas, características fermentativas, composição bromatológica e estabilidade aeróbia de silagens de milho.

No Capítulo IV, com o objetivo de avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus buchneri* nas silagens inoculadas com bactérias liofilizadas e ativadas em leite desnatado reconstituído (LDR) antes da ensilagem, realizou-se a identificação de microrganismos através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR).

CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO

EFEITO DA ADIÇÃO DE UREIA E *LACTOBACILLUS* *BUCHNERI* EM SILAGENS

Efeito da Adição de Ureia e *Lactobacillus buchneri* em Silagens

1. Introdução

A ensilagem é uma técnica de preservação de forragens úmidas baseada na fermentação anaeróbia, onde bactérias ácido lácticas metabolizam açúcares solúveis a ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico. Com isso, a biomassa se torna acidificada e as forragens são preservadas até a penetração do ar (RUTENBERG et al., 2016).

A qualidade da silagem está diretamente ligada ao processo fermentativo que ocorre no silo. Os principais fatores que podem interferir na fermentação da silagem estão associados às características da forrageira utilizada, como conteúdo de matéria seca à colheita, concentração de carboidratos solúveis, substâncias tamponantes e populações de microrganismos presentes na forragem (McDONALD et al., 1991).

Quando as características da forrageira limitam a qualidade do processo fermentativo, indica-se a utilização de aditivos na ensilagem. Como a fermentação é um processo dinâmico afetado por uma variedade de fatores, diferentes pesquisas sobre o uso de aditivos em silagens têm sido conduzidas no intuito de se obter melhorias do material ensilado (YITBAREK e TAMIR, 2014).

Existe uma diversidade de aditivos para ensilagem e diferentes situações de uso. Há aditivos que estimulam a fermentação, enquanto outros inibem a ação de microrganismos indesejáveis (ARAKI et al., 2017). Ainda, há aditivos que elevam o valor nutritivo do alimento final, aumentam o conteúdo de matéria seca da silagem e melhoram a resistência da massa ensilada quando exposta ao ar (VIEIRA et al., 2004).

Um dos principais motivos para o uso de aditivos no processo de ensilagem é a redução do risco de ocorrência de fermentação de baixa qualidade, o que gera perdas consideráveis e decréscimo do valor nutritivo do alimento final (VIEIRA et al., 2017). Com maior frequência, os aditivos são utilizados em situações onde os efeitos da adversidade do ambiente dentro do silo influenciam a fermentação da silagem com baixo e/ou elevado teor de matéria seca ou de carboidratos solúveis.

A deterioração aeróbia da silagem reduz consideravelmente a qualidade do alimento, podendo implicar em perdas expressivas. Todas as silagens expostas ao ar deterioram, como resultado da atividade microbiana aeróbia. Esse processo de deterioração pode atingir diferentes graus e ocasionar perdas de até 20% de matéria seca (TABACCO et al., 2011), mesmo em silagens com perfil fermentativo adequado, como a silagem de milho, tanto em condições ambientais de clima temperado (TABACCO et al., 2011), quanto de clima tropical (HUISDEN et al., 2009).

A presença de oxigênio é deteriorante às silagens, devido ao crescimento oportunista de microrganismos aeróbios deletérios, especialmente leveduras e bolores (WOOLFORD, 1990). O uso de aditivos de natureza química e/ou biológica em silagens que apresentam adequado perfil fermentativo, como o milho, visa elevar a estabilidade aeróbia e reduzir as perdas relacionadas à deterioração aeróbia.

As modificações decorrentes do uso de aditivos em silagens, principalmente no perfil fermentativo das silagens, podem alterar a composição final do alimento e afetar o consumo de matéria seca e a digestibilidade de nutrientes (NEUMANN et al., 2010).

Tradicionalmente, os aditivos têm sido utilizados na tentativa de solução das limitações das forrageiras no processo de ensilagem, minimizando perdas e assegurando um alimento de qualidade ao animal. Contudo, determinados resultados indicam que alguns aditivos de natureza biológica podem influenciar a produtividade animal (ELLIS et al., 2016; WEINBERG et al., 2016).

Objetivou-se nesta revisão, descrever os principais efeitos da adição de ureia e *Lactobacillus buchneri* em diferentes silagens.

2. Tipos de Aditivos e Seus Efeitos Sobre a Qualidade da Silagem

Aditivos são produtos naturais e/ou industriais que controlam ou previnem determinados tipos de fermentações, reduzindo as perdas e melhorando a estabilidade aeróbia das silagens. Vários aditivos têm sido usados para incrementar o valor nutritivo e recuperação de matéria seca das silagens, frequentemente com subsequente melhoria no desempenho animal (YITBAREK e TAMIR, 2014).

Segundo Henderson (1993), o aditivo considerado ideal deve proporcionar segurança no manuseio, contribuir à diminuição de perdas de matéria seca, melhorar a qualidade higiênica da silagem, restringir fermentações indesejáveis, elevar o valor nutritivo do alimento final e promover aumento da estabilidade aeróbia, oferecendo o maior retorno na produção animal em relação ao custo. Embora haja diferentes estudos realizados e ainda em andamento, dificilmente um aditivo apresentará todas essas características.

Aditivos em silagens têm sido desenvolvidos e usados por muitos anos. A função de tais aditivos variam de acordo a natureza e composição das silagens (RUTENBERG et al., 2016). Eles são aplicados na ordem de melhorar a fermentação, redução de perdas, incremento do valor nutritivo e aumento da estabilidade aeróbia quando as silagens são expostas ao ar (HUISDEN et al., 2009).

A classificação dos aditivos utilizados no processo de ensilagem se dá, geralmente, em função de suas características físico-químicas, finalidade de uso, ação esperada (SCHMIDT et al., 2014) ou natureza do material.

De acordo com Woolford (1984), as limitações das características das forrageiras, como baixo teor de matéria seca e/ou carboidratos solúveis para ensilagem, acentua a demanda para o uso de aditivos. Entretanto, o desenvolvimento de pesquisas relacionadas a aditivos em silagens apresentou “fases de modismos”, o que promoveu deliberadamente o uso de aditivos (algumas vezes de forma incorreta).

A classificação dos aditivos, proposta por este autor, considera o princípio ativo (modo de ação) das substâncias utilizadas no processo de ensilagem, dividindo-se os aditivos nos seguintes grupos: 1) acidificantes diretos (ácidos orgânicos e inorgânicos); 2) inibidores de fermentação (esterilizantes de ação direta e indireta); 3) estimulantes da fermentação (substratos, enzimas e culturas microbianas); 4)

antimicrobianos específicos (antibióticos, antibióticos sintéticos e outros agentes antimicrobianos); 5) nutrientes (energia, nitrogênio e minerais).

No seu livro “Biochemistry of silage”, McDonald et al. (1991) descreveram classificação para os aditivos em silagens, de acordo com o princípio ativo no processo de ensilagem. Contudo, considerando-se também o fenômeno natural de deterioração aeróbia na fase de abertura e descarga dos silos, onde se expõe a massa ensilada à aerobiose, e a capacidade absorviva dos aditivos.

Os cinco grupos de classificação são: 1) estimuladores de fermentação (culturas bacterianas e fonte de carboidratos solúveis); 2) inibidores de fermentação (ácidos orgânicos e inorgânicos e outros); 3) inibidores de deterioração aeróbia; 4) nutrientes (farelos, polpas, ureia e outros); 5) absorventes (aditivos com alto teor de matéria seca).

Corroborando com o trabalho de McDonald et al. (1991), Kaiser (1999) descreveu em seu capítulo de livro “Silage Additives” a classificação internacionalmente aceita para os aditivos em silagens:

1. Estimuladores da fermentação: promove a fermentação láctica desejável na massa ensilada. Subclassificados em fonte de carboidratos solúveis (aditivos que disponibilizam maior quantidade de substratos fermentescíveis para as bactérias lácticas converterem em ácidos orgânicos, como melaço, sacarose, glicose, polpa cítrica, dentre outros); enzimas (celulase, hemicelulase, amilase); inoculantes (cepas de bactérias ácido lácticas).

2. Inibidores de fermentação: acidificam diretamente e esterilizam a silagem, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis. São eles ácidos e sais de ácidos orgânicos (ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido propiônico); outros inibidores de natureza química (formaldeído, nitrito de sódio, metabissulfito de sódio).

3. Inibidores de deterioração aeróbia: especificamente destinados à melhoria da estabilidade aeróbia das silagens (ácido propiônico, ácido acético, amônia, alguns inoculantes).

4. Nutrientes: adicionado para melhorar o valor nutritivo das silagens (ureia, amônia, grãos, minerais, polpa de frutos).

5. Absorventes: utilizados para prevenir perdas por efluentes, aumentando o conteúdo de matéria seca da silagem e/ou através da absorção de umidade (grãos, palhas, farelos).

Nesta classificação, o mesmo aditivo pode ser incluído em diferentes categorias, como exemplo, os farelos, que podem ser considerados aditivos estimuladores de fermentação (devido ao seu conteúdo considerável de carboidratos), nutrientes (incremento do valor nutritivo da silagem) e absorventes (elevado teor de matéria seca).

Na tentativa de se reduzir o confundimento e a ambiguidade das categorias na classificação dos aditivos, Nussio e Schmidt (2004) sugeriram uma nova classificação dos aditivos. Basicamente, os autores dividiram as substâncias de acordo com o princípio ativo e a natureza de origem, formando-se então três categorias: 1) aditivos químicos; 2) aditivos microbianos (subgrupos de bactérias homofermentativas e heterofermentativas); 3) aditivos sequestradores de umidade.

3. Uso de Aditivo Químico e Microbiano em Silagens

A conservação de forragens na forma de silagem envolve um complexo processo bioquímico e microbiológico, desde a colheita à sua utilização na alimentação animal (CARVALHO et al., 2008). Essas reações químicas e biológicas geralmente alteram a estrutura da forrageira, assim como o seu valor nutritivo. O uso de aditivos na ensilagem pode alterar tanto o perfil fermentativo, as perdas fermentativas, a estrutura, o valor nutritivo e a estabilidade aeróbia das forrageiras ensiladas (YITBAREK e TAMIR, 2014).

Os aditivos químicos são substâncias que atuam no controle das reações químicas e biológicas na ensilagem. Podem atuar de forma seletiva na massa ensilada, atingindo as populações de microrganismos deletérios à silagem ou sem distinção sobre o processo fermentativo. Possuem diferentes propriedades e mecanismos de ação, podendo auxiliar no pH da silagem, na redução de microrganismos indesejáveis através de atividade bacteriostática e antifúngica, hidrólise da parede celular, incremento de nitrogênio à massa ensilada e redução da respiração celular da forrageira ensilada (NEUMANN et al., 2010).

Os aditivos químicos de natureza alcalina são empregados, preferencialmente, na ensilagem de forrageiras com altos teores de carboidratos solúveis e, consequente, elevada produção de ácido láctico. Estes aditivos atuam diretamente no controle do pH, impedindo acidificação excessiva, e na atividade de microrganismos como fungos filamentosos e leveduras (BALIEIRO NETO et al., 2009).

Dentre os principais aditivos químicos estudados, destaca-se a ureia, por possuir propriedades antimicrobianas, reduzir as perdas no processo fermentativo (SARIÇIÇEK e KILIÇ, 2009), retardar o rápido abaixamento do pH em silagens com elevadas concentrações de carboidratos solúveis (VIEIRA et al., 2017), incrementar o valor nutritivo da massa ensilada (FERNANDES et al., 2009) e aumentar a estabilidade aeróbia das silagens.

A ureia é um aditivo de baixo custo, de simples manuseio e facilmente encontrado no mercado. Possui características que a classifica como aditivo inibidor de fermentação e aditivo nutriente, pois melhora o valor nutritivo das silagens (McDonald et al., 1991).

Além dos aditivos químicos, os aditivos microbianos apresentam vantagens como facilidade e segurança no uso, não corroem equipamentos, não poluem o ambiente e são considerados produtos naturais (ROWGHANI e ZAMIRI, 2009).

As bactérias lácticas (BAL) são as principais espécies de microrganismos utilizadas como aditivos em silagens, podendo ser classificadas a partir do metabolismo de carboidratos solúveis: bactérias homo e heterofermentativas obrigatórias e/ou facultativas (MUCK, 2010; SCHMIDT et al., 2014). As bactérias homofermentativas obrigatórias produzem ácido láctico a partir de hexoses, como a glicose; enquanto bactérias heterofermentativas facultativas e obrigatórias convertem hexoses e pentoses a ácido láctico, ácido acético e etanol, produzindo dióxido de carbono (MUCK, 2010).

O ácido láctico é o principal ácido orgânico reconhecidamente capaz de reduzir o pH da massa ensilada e evitar o desenvolvimento de microrganismos deletérios no processo fermentativo. Por isso, as bactérias ácido lácticas foram as primeiras espécies utilizadas como inoculantes em silagens (McDONALD et al., 1991; Fylia et al., 2007).

Devido à sua intensa atividade produtora de ácido láctico, resultando em rápido declínio do pH, baixa produção de etanol e amônia nas silagens, cepas de bactérias homofermentativas, como *Lactobacillus plantarum*, estão presentes em inoculantes até a atualidade (JATKAUSKAS e VROTNIAKIENE, 2011). A redução do pH da massa ensilada ocasionada pela atividade de cepas inoculadas de bactérias ácido lácticas (BAL) beneficia a qualidade da silagem por reduzir os riscos de crescimento de microrganismos deletérios como bactérias produtoras de ácido butírico (McDONALD et al., 1991).

Após intenso estudo e ampla recomendação de BAL homofermentativas (FYLIA et al. 2006; PARVIN e NISHINO, 2009; TABACCO et al., 2011), pesquisas indicam que silagens com fermentação predominantemente homoláctica são mais susceptíveis à deterioração aeróbia (OLIVEIRA et al., 2011) e as cepas de BAL heterofermentativas se destacaram por melhorar a estabilidade aeróbia das silagens, principalmente por converter ácido láctico em ácido acético sob condições anaeróbias (OUDE ELFERINK et al., 2001). Com isso, os inoculantes microbianos usados como aditivos em silagens incluem bactérias homofermentativas e/ou heterofermentativas (ZOPOLLATTO et al., 2009).

O ácido láctico, embora seja importante no processo fermentativo e conservação do material ensilado, não possui atividade antifúngica que impeça o desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras na fase de abertura e descarga do silo. O ácido acético, por sua vez, inibe o crescimento de populações de bolores e leveduras, preservando as silagens após a exposição ao ar (FYLIA et al., 2007).

Embora as pesquisas desenvolvidas atualmente sejam majoritariamente com aditivos microbianos, ressalta-se que os resultados positivos nas características fermentativas das silagens nem sempre são evidentes e há muita controvérsia no uso destes, pois os resultados obtidos se apresentam inconstantes (KUNG JR et al., 2003; MUCK, 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

A diversidade de pesquisas com aditivos microbianos tem sido crescente nos últimos anos, aprofundando-se o grau de conhecimento sobre a dinâmica de atuação das bactérias na massa ensilada. As principais espécies estudadas representam as fermentadoras homolácticas (*Lactobacillus plantarum*) e as fermentadoras heterolácticas (*Lactobacillum buchneri*), ambas produtoras de ácido láctico e esta última, capaz também de produzir ácido acético.

A utilização de bactérias ácido lácticas heterofermentativas visa o aumento da produção de ácidos orgânicos com propriedades antifúngicas, como o ácido acético e ácido propiônico (SCHMIDT e KUNG JR., 2010; TABACCO et al, 2011; QUEIROZ et al., 2013; GANDRA et al., 2017).

Os efeitos de inoculantes sobre a estabilidade aeróbia das silagens têm sido testados, e cepas de *Lactobacillus buchneri* são apontadas como protagonistas no aumento da resistência à deterioração aeróbia das silagens tratadas (QUEIROZ et al., 2013; GANDRA et al., 2017), devido à capacidade de conversão de ácido láctico em ácido acético (OUDE ELFERINK et al. 2001).

4. Efeito da Adição de Ureia nas Silagens

A ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) é uma substância que contém entre 42 a 45% de nitrogênio, sendo muito utilizada na amonização de forragens devido a facilidade de sua aplicação, não ser substância poluente e ser fonte de nitrogênio não proteico (NEUMANN et al., 2010). É considerada um aditivo inibidor de deterioração aeróbia, controlando a deterioração causada pelo ar quando o silo é aberto, assim como também é um aditivo nutriente, tendo em vista a melhoria do valor nutritivo da silagem (MCDONALD et al., 1991).

A utilização da ureia em diferentes silagens tem sido descrita na literatura, tanto para a preservação da composição dos nutrientes da forrageira no processo fermentativo, quanto para melhoria do valor nutritivo do material ensilado e aumento da estabilidade aeróbia das silagens após abertura do silo.

Em situações adversas como forrageiras com elevado ou baixo teor de matéria seca e carboidratos solúveis, entre outros, a degradação aeróbia decorrente da multiplicação de microrganismos indesejáveis, como os fungos, requer a utilização de aditivos que possuam ação de inibição do desenvolvimento destas populações microbianas deletérias. A ureia atua de forma positiva nestas circunstâncias (NEUMANN et al., 2010).

A atuação da ureia sobre o pH das silagens, elevando-o a uma faixa adequada à atividade das bactérias ácido lácticas, impede o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Essa resistência à queda brusca do pH, associada à

ação antifúngica, promove a redução de perdas associadas à produção de gases e efluentes (VIEIRA et al. 2017).

A conversão de ureia em amônia na massa ensilada beneficia o processo fermentativo das silagens (MIRANDA et al., 2011). Silagens como a cana de açúcar, onde há perdas consideráveis devido à excessiva produção de etanol pelas leveduras podem apresentar redução significativa na população de fungos quando tratadas com ureia (ARAKI et al., 2017).

A ureia possui ação fungistática no metabolismo das leveduras. As leveduras são microrganismos auxotróficos, dependendo estritamente da disponibilidade de uma combinação específica entre fontes de carbono e fontes de nitrogênio para se desenvolverem. As fontes de carbono preferenciais são glicose e galactose, enquanto glicerol e ribose apresentam potencial inferior de desenvolvimento de leveduras. Assim como as fontes de carbono, as fontes de nitrogênio para a rápida multiplicação de leveduras são necessárias, sendo preferencial a disponibilidade de glutamina no meio (VANDERSLUIS et al., 2014).

Fontes de carbono para crescimento de leveduras, como a glicose, geralmente não são limitantes em forrageiras ensiladas, como milho, sorgo e cana de açúcar. Entretanto, diferentes trabalhos apontam a redução das populações de leveduras quando se aplica ureia na ensilagem destas forrageiras (MIRANDA et al., 2011; VIEIRA et al., 2017). A ureia é uma fonte pobre de nitrogênio para as leveduras (VANDERSLUIS et al., 2014), logo, a aplicação de ureia na ensilagem promove o aumento da concentração de amônia na massa ensilada, retardando o desenvolvimento das leveduras, uma vez que promove desbalanço na relação específica de substratos para o crescimento de leveduras.

Ainda, de acordo com Hess et al. (2006), o aumento da concentração de amônio é tóxico às leveduras, obrigando-as a modificarem o metabolismo de nitrogênio, incorporando o amônio na formação e excreção de aminoácidos como a glutamina ou glutamato, na presença de teores adequados de potássio.

Além de impedir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e alterar o perfil fermentativo da silagem através da amônia liberada por sua hidrólise, a ureia promove melhorias no valor nutritivo das silagens a partir da incorporação de nitrogênio na massa ensilada, elevando o valor proteico das silagens (FERNANDES

et al., 2009). A incorporação de nitrogênio na massa ensilada, a partir da aplicação de ureia, elevou os valores de proteína bruta de 34,5 g/kg MS para 110 g/kg MS em silagens de cana de açúcar (ARAKI et al., 2017).

Além do efeito de conservação das propriedades nutricionais das silagens, a ureia, através da formação natural de amônia na reação de hidrólise pela enzima urease, aumenta a digestibilidade *in vitro* de MS das silagens, devido à maior disponibilidade de nitrogênio não proteico aos microrganismos ruminais (ARAKI et al., 2017).

A ureia atua sobre a fração fibrosa da massa ensilada a partir de suas reações: a ureólise, que consiste numa reação enzimática onde ocorre a liberação da amônia através da hidrólise da ureia; e a amoniólise.

As bactérias ureolíticas produzem a urease (enzima catalisadora presente nas plantas) que atua na presença de umidade, hidrolisando a ureia e produzindo duas moléculas de amônia (que atua diretamente na parede celular das forragens) e uma de dióxido de carbono (WILLIAMS et al., 1984; NEUMANN et al., 2010).

A partir da hidrólise da ureia, ocorre a reação química de amoniólise entre a amônia e as ligações do tipo éster existentes entre cadeias de hemicelulose e entre os grupos de carboidratos ou moléculas de carboidratos e lignina (FADEL et al., 2003). A amoniólise provoca uma lise nas ligações entre os carboidratos estruturais, liberando-os e, conseqüentemente, aumentando a superfície de contato aos microrganismos do rúmen (TARKOW e FEIST, 1969).

Além destas reações, há outro fator importante a se considerar: a amônia apresenta alta afinidade com a água resultando na formação de uma base fraca, o hidróxido de amônio (NH_4OH). A alta afinidade da amônia com a água promove expansão da parede celular e ruptura dos componentes dos tecidos de forragens aditivadas com ureia. Através de estudos específicos de microscopia eletrônica, pode-se constatar essa alteração da parede celular (ROSA e FADEL, 2001).

A reação química que origina o hidróxido de amônio promove elevação do pH da massa ensilada devido a formação desta base fraca. O hidróxido de amônio é uma solução aquosa que atua através da hidrólise alcalina das ligações do tipo éster dos compostos da parede celular, alterando o pH da massa ensilada (BUETTNER et al., 1982).

A amônia liberada nas reações dentro do silo é uma substância volátil e a alta produção de ácidos orgânicos pode ser benéfica em converter amônia a produtos menos voláteis como sais de amônio: lactato de amônio e acetato de amônio (LOPEZ et al., 1970).

Quando os ruminantes consomem dietas com baixo teor proteico, uma fonte de nitrogênio, como a amônia, seria insuficiente para o crescimento microbiano no rúmen, sendo necessário disponibilizar fonte de amônia extra na dieta, através de fontes proteicas naturais, como o farelo de soja ou de nitrogênio não proteico, como a ureia (SUGIMOTO et al., 2007).

A adição de ureia na ensilagem de forrageiras contribui para o aumento dos compostos nitrogenados das silagens de gramíneas tropicais, sugerindo incorporação de parte do nitrogênio aplicado. Considerando-se um sistema de alimentação de ruminantes, a elevação dessas frações nitrogenadas podem beneficiar a fermentação ruminal e promover maior síntese de proteína microbiana (OLIVEIRA et al., 2007), além de melhorar o perfil fermentativo das silagens e consequentemente reduzir perdas (FERNANDES et al., 2009).

Em estudos para se avaliar o efeito da ureia sobre o consumo e a digestibilidade de silagem de polpa de batata como suplemento a novilhos, Sugimoto et al. (2007) não verificaram efeito da adição de ureia sobre o consumo e a digestibilidade da silagem de polpa de batata. Entretanto, houve efeito sobre a degradabilidade efetiva do feno quando se considerou a dieta total, sugerindo-se que a ação química da amônia derivada da ureia reduz a resistência da parede celular vegetal e solubiliza parte da fração fibrosa do material ensilado durante o processo fermentativo. Esta suposição pode ser parcialmente explicada por menor conteúdo de FDN encontrado nas silagens tratadas com ureia quando comparadas com silagens não tratadas. Embora a ingestão de silagem de polpa de batata tratada com ureia não apresentasse efeito sobre o pH ruminal, houve flutuações na concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen (SUGIMOTO et al., 2007).

Resultados diferentes foram obtidos quando a ureia foi aplicada a silagens de palha de arroz fresca (FANG et al., 2012). A palha de arroz é uma forragem de baixa digestibilidade de nutrientes devido à sua elevada lignificação, alto teor de sílica e baixo teor proteico. A ensilagem da palha de arroz fresca com adição de ureia

promoveu efeitos positivos na composição química e digestibilidade das silagens. Verificaram-se aumentos significativos no valor nutritivo das silagens para o conteúdo proteico (+3,9%) e amônia (+22%), com base na matéria seca. Houve redução do teor de fibra solúvel em detergente neutro, de 63,4% nas silagens não tratadas a 58,9% nas silagens tratadas com ureia (FANG et al., 2012).

Fang et al. (2012) observaram aumento significativo na digestibilidade de MS (+8,9%), PB (+3,9%), FDN (+8,3%), NDT (+6,2%), com base na matéria seca. O aumento da digestibilidade das silagens tratadas com ureia deveu-se, segundo os autores, à conversão da ureia em hidróxido de amônio e, consecutivamente em amônia, capaz de atuar nas ligações entre lignina e carboidratos, disponibilizando maior quantidade de substâncias solúveis.

A maior disponibilidade de proteína degradável no rúmen (PDR) é uma das razões pelo qual também se utiliza ureia em silagens de milho. Embora a silagem de milho seja uma excelente forragem para ruminantes por seu alto teor de energia digestível, o aumento da concentração de PDR pode elevar a síntese de proteína microbiana no rúmen e beneficiar o animal (NRC, 2001). Este aumento pode ser obtido através da adição de ureia no momento da ensilagem (BOUCHER et al., 2007).

4. Efeito da Adição de *Lactobacillus buchneri* nas Silagens

A deterioração aeróbia das silagens pode alterar a qualidade do alimento. A sensibilidade das silagens à deterioração aeróbia é um fator problemático para esta técnica de conservação de forragens (TABACCO et al., 2011). Todas as silagens são suscetíveis à deterioração aeróbia causada por microrganismos oportunistas que assimilam carboidratos e proteínas solúveis e até o ácido láctico (FYLIA et al., 2006).

Uma alternativa para se minimizar a redução de perdas e risco de produção de toxinas (fungos) é a inoculação. Diferentes aditivos foram estudados e a eficiência em combater fermentações indesejáveis durante o processo fermentativo e após a abertura do silo registrada.

Os inoculantes bacterianos constituem os aditivos mais utilizados para se obter aumento da estabilidade aeróbia das silagens, principalmente cepas de *Lactobacillus buchneri*, capazes de converter ácido láctico em ácido acético (OUDE ELFERINK et al., 2001), que possui propriedade antifúngica.

As bactérias lácticas homofermentativas, comumente produzem rapidamente ácido láctico na massa ensilada, o que reduz o pH e promove a preservação da silagem. Bactérias heterofermentativas, por sua vez, são capazes de atuar após a primeira fase do processo fermentativo, contribuindo para a diminuição da deterioração aeróbia a partir da produção de ácido acético (HU et al., 2009).

A inoculação de forrageiras como o milho com *Lactobacillus buchneri* promove modificações no perfil fermentativo das silagens, desviando a fermentação principal homofermentativa para a heterofermentativa, o que resulta em valores mais elevados no pH e ácido acético. Ainda, há redução das populações de fungos filamentosos e leveduras (de 5,91 para 4,96 log ufc/g) (RABELO et al., 2016).

Resultados semelhantes foram encontrados por Salvo et al. (2013), que registraram valores de 41,50 g/kg de ácido acético em silagens inoculadas com *Lactobacillus buchneri* e 27,10 g/kg em silagens não tratadas. Schmidt e Kung Jr. (2010) registraram além do aumento considerável de ácido acético, consequente elevação da estabilidade aeróbia das silagens inoculadas por estas cepas, atingindo 136 horas de estabilidade das silagens após a exposição ao ar.

Lactobacillus buchneri é uma bactéria ácido láctica, gram-positiva, catalase negativa (KOC et al., 2017), heterofermentativa, fermenta hexoses a ácido láctico, dióxido de carbono e etanol (ou ácido acético e demais produtos orgânicos) (HOLZER et al., 2003). Em condições de anaerobiose e pH ácido, *L. buchneri* é capaz de degradar o ácido láctico a ácido acético, 1,2-propanodiol e traços de etanol. Cada mol de ácido láctico pode ser convertido em 0,5 mol de ácido acético, 0,5 mol de 1,2-propanodiol e pequenas quantidades de etanol (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Entretanto, esse potencial de conversão de ácido láctico a acético não ocorre apenas em *L. buchneri*, outras bactérias lácticas também degradam ácido láctico. O que difere as bactérias *L. buchneri* das demais, é o mecanismo de conversão e os produtos orgânicos formados. Em condições anaeróbias, *L. buchneri* não exige

aceptor externo de elétrons e não produz ácido succínico, ácido fórmico e H₂ como as bactérias da espécie *L. plantarum* (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Em ensaios, com objetivo de verificar a capacidade degradante de ácido láctico de cepas de *Lactobacillus buchneri*, Oude Elferink et al. (2001) verificaram degradação lenta de ácido láctico a ácido acético e, após 55 dias de atividade destas bactérias em meio com pH 4,0, observaram elevação do pH para 4,4. Isto se deve ao potencial de acidificação do ácido acético ser inferior ao do ácido láctico. Estes autores não detectaram degradação de ácido láctico por *L. buchneri* em meio com pH 5,8, sugerindo-se que o metabolismo de degradação de ácido láctico ocorre apenas em meios com pH ácidos. A degradação do ácido láctico ocorreu significativamente mais rápido em temperatura de 15°C em meio de pH 3,8.

O conhecimento da propriedade fungicida do ácido acético (DANNER et al., 2003) predispôs à realização de diferentes ensaios visando a obtenção de aumento expressivo na estabilidade aeróbia das silagens. Espécies de microrganismos, como *Lactobacillus buchneri* têm sido empregadas na ensilagem, buscando-se elevar a concentração de ácido acético na massa ensilada (e consequente estabilidade aeróbia), sem prejuízos ao valor nutritivo das silagens (LI e NISHINO et al., 2011).

O aumento na concentração de ácido acético em silagens inoculadas com *L. buchneri* foi relatado em diferentes trabalhos (NSEREKO et al., 2008; SCHMIDT et al., 2009; LI e NISHINO et al., 2011; LIU, DONG e SHAO, 2018). Li e Nishino (2011) verificaram valores de 13,3; 20,0 e 50,6 g/kg de ácido acético em silagens de milho tratadas com *L. buchneri* em 14, 56 e 120 dias de fermentação. Além disso, relataram redução significativa de populações de leveduras nas silagens (de 6,23 log ufc/g em silagens não tratadas para 5,98 log ufc/g forragem em silagens inoculadas com *L. buchneri*, aos 120 dias de fermentação). Resultados diferentes foram encontrados por KOC et al. (2017), que não detectaram diferenças significativas na composição das populações microbianas de silagens de alfafa inoculadas com *L. buchneri*.

A inoculação de silagens com *L. buchneri* pode restringir a produção de ácido butírico na massa ensilada, reduzindo as populações de bactérias aeróbias e elevando a estabilidade aeróbia das silagens (LIU, DONG e SHAO, 2018).

Embora apresente atividade sobre o perfil fermentativo e estabilidade aeróbia das silagens, *L. buchneri* possui crescimento lento, sendo verificados seus efeitos a partir de 45 a 60 dias (OUDE ELFERINK et al., 2001; SCHMIDT et al., 2009).

O lento desenvolvimento deste microrganismo se deve ao metabolismo de conversão de ácido láctico a ácido acético em meio de pH ácido. Como as bactérias lácticas homofermentativas multiplicam-se de forma acelerada, diminuindo o pH da massa ensilada rapidamente devido à maior produção de ácido láctico, as bactérias *L. buchneri* limitam o seu crescimento e ativam o metabolismo de degradação de ácido láctico, como estratégia de manutenção da viabilidade celular (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Ao avaliar o desenvolvimento de *L. buchneri* em silagens de alfafa inoculadas, Schmidt et al. (2009) observaram o comportamento de crescimento destas bactérias, detectando o predomínio de *L. buchneri* somente após 45, 90 e 180 dias de fermentação.

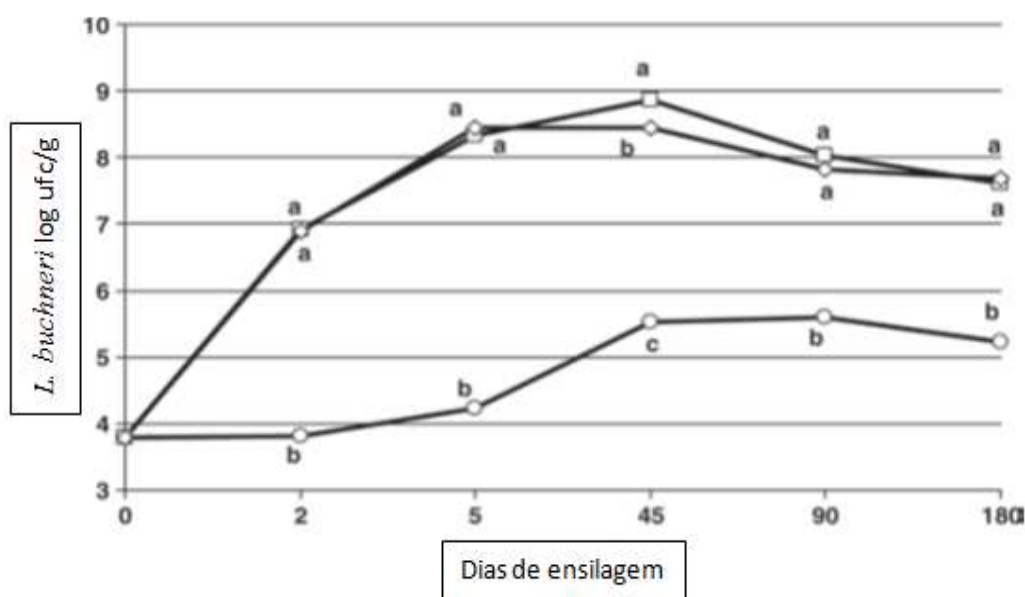


Figura 1. Populações de *L. buchneri* em silagens de alfafa durante a ensilagem. Silagens não tratadas (○); Silagens inoculadas com *L. buchneri* (□); Silagens inoculadas com *L. buchneri* e *Pediococcus pentosaceus* (◇).

Pontos_{abc} correspondem aos dias específicos com diferenças significativas ($P < 0,05$).

O conteúdo de fibra em detergente neutro pode ser alterado pela atividade de *L. buchneri* na forragem. De acordo com Nsereko et al. (2008), cepas de *L. buchneri* são capazes de produzir a enzima ácido ferúlico esterase, que pode

aumentar a susceptibilidade da parede celular à hidrólise enzimática. Os autores ainda observaram efeito da inoculação na elevação do pH e conteúdo de ácido acético (de 13,1 g/kg MS nas silagens controle para 43,2 g/kg MS em silagens inoculadas). Verificou-se aumento de 44 horas na estabilidade aeróbia das silagens de azevém.

Corroborando com Nsereko et al. (2008), Koc et al. (2017) verificaram redução de FDN nas silagens inoculadas com *L. buchneri*. Ainda, observaram aumento significativo na digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica nas silagens de alfafa.

Alguns trabalhos mais recentes verificaram efeito probiótico de *Lactobacillus buchneri* na suplementação alimentar de espécies de animais não ruminantes, como coelhos, que tem se apresentado eficiente na melhoria da microbiota intestinal, diminuindo os valores de *Escherichia coli* (ZHOU et al., 2018). Mais estudos sobre o efeito de *L. buchneri* no funcionamento do aparelho digestivo devem ser realizados.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de ureia e a inoculação da massa ensilada com *Lactobacillus buchneri* podem promover melhorias no perfil fermentativo, valor nutritivo, redução de perdas e aumento da estabilidade aeróbia das silagens.

Embora os aditivos possam atuar beneficiando a fermentação das silagens, é imprescindível a realização correta da técnica de ensilagem, respeitando-se todas as fases e exigências das forrageiras a ser ensiladas. A depender das características da forrageira, os aditivos promovem melhorias no perfil fermentativo das silagens, contudo, é importante ressaltar que a dosagem, forma de aplicação e tempo de armazenamento influenciam diretamente nos resultados obtidos.

6. REFERÊNCIAS

ARAKI, H.C.M.; DE OLIVEIRA, E.R.; GANDRA, J.R.; DE GOES, R.H.T.B.; TAKIYA, C.S.; JACAÚNA, A.G.; OLIVEIRA, K.M.P.; VASQUES, D.N.; BRANDÃO CÔNSOLO, N.R.; DEL VALLE, T.A.; ORBACH, N.D. Association of biological and chemical additives on nutrient composition, total losses, microbiological and fermentative profile of sugarcane silage. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 7, n. 4, p. 577-584. 2017.

http://journals.iau.ir/article_535722.html

BALIEIRO NETO, G.; SIQUEIRA, G.R.; NOGUEIRA, J.R.; REIS, R.A.; ROTH, A.P.T.P.; ROTH, M.T.P. Perdas fermentativas e estabilidade aeróbia de silagens de cana de açúcar aditivadas com cal virgem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.24-33, 2009.

<http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/1289/761>

BOUCHER, S.E.; ORDWAY, R.S.; WHITEHOUSE, N.L.; LUNDY, F.P.; KONONOFF, P.J.; SCHWAB, C.G. Effect of incremental urea supplementation of a conventional corn silage-based diet on ruminal ammonia concentration and synthesis of microbial protein. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. 5619-5633. 2007.

<http://doi.org/10.3168/jds.2007-0012>

BUETTNER, M.R.; LECHTENBERG, V.L.; HENDRIX, K.S. et al. Composition and digestion of ammoniated tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb) hay. **Journal of Animal Science**, v. 54, n. 1, p. 173-178, 1982.

<https://academic.oup.com/jas/article-abstract/54/1/173/4662745>

CARVALHO, G.G.P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V.; PEREIRA, O.G.; FERNANDES, F.E.P.; CARVALHO, B.M.A. Características fermentativas de silagens de capim-elefante emurhecido ou com adição de farelo de cacau. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 234-242, 2008.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352008000100032>

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n. 1, p. 562-567, 2003.

<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.1.562-567.2003>

ELLIS, J.L.; BANNINK, A.; HINDRICHSEN, I.K.; KINLEY, R.D.; PELLIKAAN, W.F.; MILORA, N.; DIJKSTRA, J. Effect of lactic acid bacteria inoculants on in vitro rumen organic matter digestibility, total gas and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, v. S0377-8401, n. 15, p. 30055-9, 2016.

<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.10.016>

FADEL, R.; ROSA, B.; OLIVEIRA, I.P.; OLIVEIRA, J.D.S. Avaliação de diferentes proporções de água e de ureia sobre a composição bromatológica da palha de arroz. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 101-107, 2003.

<http://revistas.bvs-vet.org.br/cab/article/view/4700/3959>

FANG, J.; MATSUZAKI, M.; SUZUKI, H.; CAI, Y.; HORIGUCHI, K.; TAKAHASHI, T. Effects of lactic acid bacteria and urea treatment on fermentation quality, digestibility and ruminal fermentation of roll bale rice straw silage in wethers. **Grassland Science**, v. 58, p. 73-78. 2012.

<http://doi.org/10.1111/j.1744-697X.2012.00244.x>

FERNANDES, F.E.P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V.; PEREIRA, O.G.; CARVALHO, G.G.P.; OLIVINDO, C.S. Ensilagem de sorgo forrageiro com adição de ureia em dois períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n.11, p. 2111-2115, 2009.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009001100006>

FILYA, I.; MUCK, R.E. Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.8108-5114, 2007.

<https://doi.org/10.3168/jds.2006-877>

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

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03038.x>

GANDRA, J. R.; OLIVEIRA, R. R.; GANDRA, E. R. S.; TAKIYA, C. S.; GOES, R. H. T. B.; OLIVEIRA, K.M.P.; SILVEIRA, K. A.; ARAKI, H. M. C.; ORBACH, N. D.; VASQUEZ, D. N. Inoculation of *Lactobacillus buchneri* alone or with *Bacillus subtilis* and total losses, aerobic stability, and microbiological quality of sunflower silage. **Journal of Applied Animal Research**, v.45, n.1, p.609–614, 2017.

<https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1249874>

HENDERSON, N. Silage additives. **Animal Feed Science and Technology**, v.45, p.35-56, 1993.

[https://doi.org/10.1016/0377-8401\(93\)90070-Z](https://doi.org/10.1016/0377-8401(93)90070-Z)

HESS, D.C.; LU, W.; RABINOWITZ, J.D.; BOTSTEIN, D. Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. *Plos Biology*, v. 4, n. 11, p.2012-2023. 2006.

<http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040351>

HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; DANNER, H.; BRAUN, R. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *TREND in Biotechnology*, v. 21, n. 6, p.282-287. 2003.

[http://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00106-9](http://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00106-9)

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

<http://doi.org/10.3168/jds.2008-1788>

HUISDEN, C. M.; ADESOGAN, A. T.; S. C. KIM, S. C.; OSOSANYA, T. Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 690–697, 2009.

<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1546>

JATKAUSKAS, J.; VROTNIAKIENE, V. The effects of silage inoculants on the fermentation and aerobic stability of legume-grass silage. **Žemdirbystė Agriculture**, v.98, n.4, p.367–374, 2011.

[http://www.lzi.lt/tomai/98\(4\)tomas/98_4_tomas_str4.pdf](http://www.lzi.lt/tomai/98(4)tomas/98_4_tomas_str4.pdf)

KAISER, A.G. Silage Additives. **Department of Primar Industries, Wagga Wagga**. Agricultural institute, Wagga Wagga, NSW. 1999.

KOC, F.; ZKSOY, O.; OKURI, A.A.; CLIKYURT, G.; KORUCU, D.; OZDUVEN, M.L. Effect of pre-fermented juice, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* on the fermentation characteristics and aerobic stability of high dry matter alfalfa bale silage. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 27, n. 5, p. 1426-1431. 2017.

[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74912-5](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74912-5)

LI, Y.; NISHINO, N. Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. **Grassland Sciences**, v. 57, p. 184-191. 2011.

<http://doi.org/10.1111/j.1744-697X.2011.00226.x>

LIU, Q.H.; DONG, Z.H.; SHAO, T. Effect of additives on fatty acid profile of high moisture alfalfa silage during ensiling and after exposure to air. **Animal Feed Science and Technology**, v. 236, p. 29-38. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.022>

LOPEZ, J.; JORGENSEN, N.A.; LARSEN, H.J. et al. Effect of nitrogen source, stage of maturity, and fermentation time on pH and organic acid production in corn silage. **Journal Dairy Sciences**, v. 53, n. 9, p. 1225-1232. 1970.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86372-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86372-X)

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

MIRANDA, D. C. L.; JÚNIOR, G. S. D.; LOPES, F.; PEREIRA, R. A. N.; PEREIRA, M. N. Composição e pH de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químicos e microbiológicos. **Revista de Ciências Agrárias**, v.54, n.2, p.122-130, 2011.

<https://dx.doi.org/10.4322/rca.2012.005>

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

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300021>

NEUMANN, M.; OLIBONI, R.; OLIVEIRA, R.M.; FARIA, M.V.; UENO, R.K.; REINERH, L.L.; DURMAN, T. Aditivos químicos utilizados em silagens. **Pesquisa aplicada & Agrotecnologia**, v. 3, n. 2, 2010.

<http://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/viewFile/1155/1230>

NUSSIO, L.G.; SCHMIDT, P. Tecnologia de produção e valor alimentício de silagens de cana-de-açúcar. In: Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas, **Anais...** Maringá: UEM, p.1-33. 2004.

NSEREKO, V.L.; SMILEY, B.K.; RUTHEFORD, W.M.; SPIELBAUER, A.; FORRESTER, K.J.; HETTINGER, G.H.; HARMAN, E.K.; HARMAN, B.R. Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 122-135, 2008.

<http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.039>

OLIVEIRA, M. R.; NEUMANN, M.; OLIBONI, R.; GOBETTI, S. T. C.; FARIA, M. V. Uso de aditivos biológicos na ensilagem de forrageiras. **Ambiência**, v.7, n.3, p.589-601, 2011.

<http://doi.org/10.5777/ambiencia.2011.03.01>

OLIVEIRA, A.C.; PIRES, A.J.V.; OLIVEIRA, H.C.; PATÊS, N.M.S.; FONCÊCA, M.P.; CARVALHO, G.G.P.; NETO, U.M.; OLIVEIRA, U.L.C.; AGUIAR, L.V.; OLIVEIRA, A.B. Composição nitrogenada de silagens de gramíneas tropicais tratadas com ureia. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, n. 213, p.15-21, 2007. ISSN 0004-0592.

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

<http://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>

PARVIN, S.; NISHINO, N. Bacterial community associated with ensilage process of wilted guinea grass. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p.2029-2036, 2009.

<http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04391.x>

QUEIROZ, O.C.M.; ARRIOLA, K.G.; DANIEL, J.L.P.; ADESOGAN, A.T. Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage. **Journal Dairy Science**, v.96, p.5836-5843, 2013.

<http://doi.org/10.3168/jds.2013-6691>

RABELO, C.H.S.; BASSO, F.C.; LARA, E.C.; JORGE, L.G.O.; HÄRTER, C.J. Effects of *lactobacillus buchneri* as a silage inoculant or probiotic on in vitro organic matter digestibility, gas production and volatile fatty acids of low dry-matter whole-crop maize silage. **Grass Forage Science**, p.1-11, 2017.

<http://doi.org/10.1111/gfs.12273>

ROSA, B.; FADEL, R. Uso de amônia anidra e de ureia para melhorar o valor alimentício de forragens conservadas. **Anais do Simpósio sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas**, p. 41-63, 2001.

<http://www.nupel.uem.br/Amonia-anidra.pdf>

ROWGHANI, E.; ZAMIRI, M.J. The effects of a microbial inoculant and formic acid as silage additives on chemical composition, ruminal degradability and nutrient digestibility of corn silage in sheep. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.10, n.2, p.110-118, 2009.

<http://doi.org/10.22099/IJVR.2009.1475>

RUTENBERG, R.; GRANIT, R.; CHEN, Y.; POVERENOV, E.; WEINBERG, Z.G. Encapsulated propionic acid as a silage additive. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 63, n.1, p.58-63, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1080/07929978.2016.1151291>

SALVO, P.A.R.; BASSO, F.C.; RABELO, C.H.S.; OLIVEIRA, A.A.; SADER, A.P.; CASAGRANDE, D.R.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. Características de silagens de milho inoculadas com *lactobacillus buchneri* e *l. plantarum*. **Archivos de zootecnia**, v.62, n.239, p.380-390, 2013.

<http://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922013000300006>

SARIÇİÇEK, Z.; KILIÇ, U. The effects of different additives on silage gas production, fermentation kinetics and silage quality. **Ozean Journal of Applied Sciences**, v. 2, n. 1. 2009.

https://www.researchgate.net/publication/236969084_The_Effects_of_Different_Additives_on_Silage_Gas_Production_Fermentation_Kinetics_and_Silage_Quality

SCHMIDT, P.; SOUZA, C.M.; BACH, B.C. Uso estratégico de aditivos em silagens: Quando e como usar? In: JOBIM, C.C.; CECATO, U.; CANTO, M.W.; BANKUTI,

F.I (eds.), simpósio: produção e utilização de forragens conservadas, 5.ed., Maringá, **Anais...** p.243-264. 2014.

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

<http://doi.org/10.3168/jds.2009-2555>

SCHMIDT, R.J.; HU, W.; MILLS, J.A.; KUNG JR., L. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation on alfalfa silage. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 5005-5010, 2009.

<http://doi.org/10.3168/jds.2008-1701>

SUGIMOTO, M.; CHIBA, T.; KANAMOTO, M.; HIDARI, H.; KIDA, K.; SAITO, W. Effects of urea treatment of potato pulp and inclusion levels of potato pulp silage in supplements on digestibility and ruminal fermentation in beef steers. **Animal Science Journal**, v. 78, p. 587-595. 2007.

<http://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2007.00479.x>

TABACCO, E.; RIGHI, F.; QUARANTELLI, A.; BORREANI, G. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.3, p.1409-1419, 2011.

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3538>

TARKOW, H., FEIST, W.C. A mechanism for improving the digestibility of lignocelulosic material with dilute alkali and liquid ammonia. **Advanced Chemistry Series**, v. 26, n. 1, p. 13-21, 1969.

<http://doi.org/10.1021/ba-1969-0095.ch012>

VANDERSLUIS, B.; HESS, D.C.; PESYNA, C.; KRUMHOL, E.W.; SYED, T.; SZAPPANOS, R.; NISLOW, C.; PAPP, B.; TROYANSKAYA, O.G.; MYERS,

C.L.; CAUDY, A.A. Broad metabolic sensitivity profiling of a prototrophic yeast deletion collection. *Genome Biology*, v. 15, p. 1-18. 2014.

<http://genomebiology.com/2014/15/4/R64>

VIEIRA, F.A.P.; BORGES, I.; STEHLING, C.A.V.; GONÇALVES, L.C.; COELHO, S.G.; RODRIGUES, J.A.S. Qualidade de silagens de sorgo com aditivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n.6, p.764-772, 2004.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352004000600011>

VIEIRA, D.A.; CEZÁRIO, A.S.; VALENTE, T.N.P.; RIBEIRO, J.C.; SANTOS, W.B.R.; FERREIRA, P.R.N. Evaluation of the addition of urea or calcium oxide (CaO) on the recovery of dry matter of the by-product of sweet corn silage. **Journal of Agricultural Science**, vol. 9, n.9, p. 141-148. 2017.

<https://doi.org/10.5539/jas.v9n9p141>

YITBAREK, M. B.; TAMIR, B. Silage additives: review. **Open Journal of Applied Sciences**, v.4, p.258-274, 2014.

<http://dx.doi.org/10.4236/ojapps.2014.45026>

WEINBERG, Z.G.; CHEN, Y.; VOLCHINSKI, V.; SELA, S.; OGUNADE, I.M.; ADESOGAN, A. An vitro model to study interaction between *Escherichia coli* and lactic acid bacterial inoculants for silage in rumen fluid. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, p. 60-65, 2016.

<https://doi.org/10.1111/lam.12587>

WILLIAMS, P.E.V.; INNES, G.M.; BREWER, A. Ammonia treatment of straw via hidrolisis of urea. Effects of dry matter and urea concentration on the rate of hidrolisis of urea. **Animal Feed Science Technology**, v. 11, n. 2, p. 115-124, 1984.

[https://doi.org/10.1016/0377-8401\(84\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(84)90015-4)

WOOLFORD, M.K. A review: the detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 101-116, 1990.

<http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02554.x>

WOOLFORD, M.K. The silage fermentation. New York: **Microbiology Series**, 350p., 1984.

ZHOU, Y.; NI, X.; WEN, B.; DUAN, L.; SUN, H.; YANG, M.; ZOU, F.; LIN, Y.; LIU, Q.; ZENG, Y.; FU, X.; PAN, K.; JING, B.; WANG, P.; ZENG, D. Appropriate dose of *Lactobacillus buchneri* supplement improves intestinal microbiota and prevents diarrhoea in weaning rex rabbits. **Beneficial Microbes**. 2018.

<http://doi.org/10.3920/BM2017.0055>

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L.G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 170-189, 2009.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009001300018>

CAPÍTULO II

EFEITO DA UREIA SOBRE A FERMENTAÇÃO, COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE MILHO

Efeito da ureia sobre a fermentação, composição bromatológica e estabilidade aeróbia de silagens de milho

RESUMO: Objetivou-se neste estudo avaliar os efeitos da adição de ureia sobre as características fermentativas, composição bromatológica, populações microbianas e estabilidade aeróbia de silagens de milho. O experimento foi conduzido no Setor de Forragicultura do Centro de Ciências Agrárias, Campus II, da Universidade Federal da Paraíba. A colheita do milho foi realizada aos 97 dias. Os tratamentos avaliados foram os níveis de adição de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de ureia, com base na matéria seca. A densidade foi de 600 kg/m³ de matéria verde. Após 70 dias da vedação, os silos foram abertos e realizaram-se as análises. As variáveis fermentativas avaliadas foram: pH, conteúdo de matéria seca, ácidos orgânicos e etanol, perdas de matéria seca, perdas por gases e efluentes, recuperação de matéria seca, composição bromatológica e contagem de populações de bactérias ácido lácticas e leveduras. As silagens foram expostas ao ar durante período de 96 horas e avaliaram-se valores de pH final, populações de leveduras, temperatura máxima atingida pelas silagens e estabilidade aeróbia. A adição de ureia na ensilagem de milho afetou significativamente o pH, conteúdo de ácidos orgânicos, etanol e proteína bruta, populações de bactérias ácido lácticas e leveduras e as perdas por efluentes das silagens ($P < 0,05$). Houve correlação positiva entre as concentrações de ácidos acéticos e propiônico, entre o teor de etanol e as perdas por efluentes e população de leveduras, entre as perdas por gases e ácido butírico, e entre as populações de bactérias ácido lácticas e pH. A adição de ureia afetou o padrão fermentativo, as perdas por efluentes, a composição bromatológica, a produção de etanol, as populações microbianas e das silagens de milho. A incorporação de nitrogênio à massa ensilada melhorou o valor nutritivo das silagens, através da disponibilidade de maiores valores de nitrogênio não proteico. Ainda, a redução de parte da fração fibrosa da forragem contribui para o maior aproveitamento do alimento. A estabilidade aeróbia das silagens de milho não tratadas com ureia perdeu-se em aproximadamente 62 horas, enquanto as silagens aditivadas a partir de 1,0% de ureia não perderam a estabilidade aeróbia até as 96 horas. A adição de ureia é indicada na ensilagem de milho devido aos seus benefícios no processo fermentativo e estabilidade aeróbia das silagens, sendo indicada a adição entre 1% a 1,5% de ureia (com base na matéria seca).

Palavras-chave: aditivo químico, deterioração aeróbia, ensilagem, leveduras.

Effects of urea on fermentation, chemical composition and aerobic stability of corn silages

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effects of urea addition on fermentation characteristics, chemical composition, microbial populations and aerobic stability of corn silages. The experiment was conducted in the Forage Sector of the Center for Agrarian Sciences, Campus II, Federal University of Paraíba. Corn harvesting was performed at 97 days. The treatments evaluated were the addition levels of 0.0; 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0% urea, based on the dry matter. The density was 600 kg/m³ of green matter. After 70 days of sealing, the silos were opened and analyzes were performed. The fermentative variables evaluated were: pH, dry matter content, organic acids and ethanol, dry matter losses, gas and effluent losses, dry matter recovery, chemical composition and lactic acid bacteria and yeast populations. The silages were exposed to air for 96 hours and final pH, yeast populations, maximum temperature reached by silages and aerobic stability were evaluated. The addition of urea to maize silage significantly affected the pH, content of organic acids, ethanol and crude protein, populations of lactic acid bacteria and yeasts, and losses by silage effluents ($P < 0.05$). There was a positive correlation between the concentrations of acetic and propionic acids, between ethanol content and losses by effluent and yeast population, between gas losses and butyric acid, and between lactic acid bacterial populations and pH. The addition of urea affected the fermentation pattern, effluent losses, chemical composition, ethanol production, microbial populations and corn silages. The incorporation of nitrogen into the ensiled mass improved the nutritive value of the silages, through the availability of higher values of non - protein nitrogen. Also, the reduction of part of the fibrous fraction of the forage contributes to the greater utilization of the food. The aerobic stability of the untreated urea corn silages was lost in approximately 62 hours, while the silages added from 1.0% urea did not lose aerobic stability until 96 hours. The addition of urea is indicated in maize ensilage due to its benefits in the fermentation process and aerobic stability of the silages, with the addition of 1% to 1,5% urea (based on dry matter) being indicated.

Keywords: chemical additive, aerobic deterioration, ensilage, yeasts.

1. INTRODUÇÃO

A ensilagem é um dos métodos mais eficientes de conservação de forragens frescas, com perdas mínimas, quando realizada corretamente. Baseada na acidificação da massa ensilada, a preservação do alimento é resultante, sobretudo, da atividade das bactérias produtoras de ácido láctico em ambiente anaeróbico, que impede substancialmente o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

Ao ensilar forrageiras úmidas, objetiva-se aumentar a preservação dos nutrientes originais na forragem com o mínimo de perdas de sua qualidade nutricional, que permite a utilização como fonte de alimentos durante períodos de escassez, evitando as oscilações da disponibilidade de forragens decorrente da sazonalidade e potencializando o uso da área da propriedade (ALONSO et al., 2013).

Dentre as espécies mais indicadas à produção de silagens, destaca-se o milho (*Zea mays* L.), por apresentar alto valor nutritivo, adequado teor de matéria seca e concentração de carboidratos solúveis, baixo poder tampão e elevada digestibilidade. Por outro lado, a elevada concentração de carboidratos solúveis (SARIÇIÇEK e KILIÇ, 2009) pode ocasionar excessiva produção de ácido láctico e predispor a massa ensilada ao desenvolvimento de leveduras, principalmente durante a exposição aeróbia na fase de descarga e alimentação animal (WEINBERG et al., 2011). De acordo com Pahlow et al., (2003), a planta de milho pode apresentar de 3 a 5 log unidades formadoras de colônias (UFC)/g de leveduras epífitas, o que pode comprometer a estabilidade aeróbia das silagens (DA SILVA et al., 2015).

As leveduras são apontadas como os microrganismos iniciantes da deterioração aeróbia das silagens, devido a assimilação de lactato (MCDONALD et al., 1991). Frequentemente, a instabilidade aeróbia associada aos fungos em silagens de milho ocorre em condições práticas de produção, principalmente nas camadas superiores do silo, que são mais propensas à deterioração.

Com isso, aditivos com propriedades antifúngicas são usados para se reduzir as populações de leveduras e aumentar a estabilidade aeróbia (TELLER et al., 2012; DA SILVA et al., 2015). Diferentes pesquisas têm sido realizadas no intuito de se reduzir as perdas durante a ensilagem e após a abertura do silo, utilizando-se aditivos

químicos como a ureia (FERNANDES et al., 2009; VIEIRA et al., 2017; ARAKI et al., 2017).

A utilização da ureia como aditivo químico em silagens com alta concentração de carboidratos solúveis, em proporções adequadas, pode promover menores perdas fermentativas e efeito tóxico à população de leveduras e mofos (VIEIRA et al., 2017). O uso da ureia em silagens está relacionado à sua transformação em amônia. Na presença de umidade e por meio da ação da urease (enzima catalisadora) das plantas e microrganismos, a ureia sofre hidrólise, produzindo duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono. A adição de ureia resulta em valores de pH e teor de ácido láctico adequados para silagens, devido ao poder tampão da amônia, evitando queda demasiada do pH (NEUMANN et al., 2010).

Além da baixa estabilidade aeróbia, silagens de milho apresentam baixas concentrações de proteína (SARIÇIÇEK e KILIÇ, 2009). O uso de nitrogênio não proteico (NNP) tem prolongado a estabilidade aeróbia das silagens e elevado a concentração de proteína em forragens com baixo teor de nitrogênio (WEISS e UNDERWOOD, 2006; SARIÇIÇEK e KILIÇ, 2009). Dessa forma, a incorporação do nitrogênio não proteico da ureia à massa ensilada pode promover acréscimo proteico no valor nutritivo das silagens (SCHMIDT et al., 2007; FERNANDES et al., 2009; FANG et al., 2012; ARAKI et al., 2017).

Objetivou-se, neste estudo, avaliar os efeitos da adição de níveis de ureia sobre as características fermentativas, composição bromatológica, populações microbianas e estabilidade aeróbia de silagens de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Ensilagem do Milho e Tratamentos

O experimento foi conduzido no Setor de Forragicultura do Centro de Ciências Agrárias (CCA), Campus II, Areia, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O híbrido de milho utilizado neste experimento foi o Ag 1051.

O milho foi cultivado na Fazenda Mata Limpa, localizada no Município de Areia, Estado da Paraíba, na microrregião do Brejo Paraibano, latitude 6°58'07" S, e

longitude 35°44'03" W e altitude de 627 m. Segundo a classificação de Köppen (quente e úmido), apresentando temperaturas médias anuais em torno de 24°C, umidade relativa do ar em torno de 80%, ocorrendo precipitação pluvial média de 1.400 mm anuais.

O híbrido utilizado neste experimento foi o Ag 1051. A colheita do milho foi realizada com idade cronológica de 97 dias, quando os grãos estavam no estágio leitoso/pastoso. O procedimento de ensilagem ocorreu no dia 09 de agosto de 2014. As plantas foram colhidas inteiras de forma manual, picadas em máquina forrageira estacionária regulada para cortar a forragem em partículas de aproximadamente 2 cm e homogeneizadas.

A forragem fresca foi transportada ao Laboratório de Forragicultura e foram tratadas com 100 ml de água destilada com ou sem aditivo: (S1) silagem sem aditivo; (S2) silagem com 0,5% de ureia (1,51 g de ureia/kg de forragem fresca); (S3) silagem com 1% de ureia (3,03 g de ureia/kg de forragem fresca); (S4) silagem com 1,5% de ureia (4,54 g de ureia/kg de forragem fresca) e (S5) silagem com 2% de ureia (6,06 g de ureia/kg de forragem fresca). As respectivas quantidades de aditivo foram diluídas em água destilada e distribuídas na forragem conforme o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

Sobre lona plástica, ocorreu a adição de ureia (com base na MS) no material picado. As dosagens de ureia diluídas foram aplicadas de forma manual, com auxílio de um spray. Misturou-se homogeneamente o aditivo à forragem para o enchimento dos silos experimentais. Imediatamente, foi realizada a compactação da forragem nos silos, buscando-se atingir massa específica de 600 kg/m³ de matéria verde. Os silos experimentais de polietileno utilizados possuíam 15 cm de diâmetro e 40 cm de altura. O fechamento dos silos foi realizado com tampa dotada de uma mangueira de borracha com um corte longitudinal adaptada a cada tampa, formando uma válvula de *Bunsen* para vazão dos gases produzidos durante os processos fermentativos da silagem, para avaliação das perdas por gases e efluentes.

Os silos foram armazenados por 70 dias à temperatura média de 24°C antes da abertura. A abertura dos silos ocorreu no dia 19 de outubro de 2014. Os pesos de todos os silos foram registrados ao início e ao final do processo fermentativo, assim

como, também foram registrados os pesos dos silos vazios. Para estimativa de perdas por gases e efluentes, utilizou-se as equações descritas por Zanine et al. (2010).

Para perdas por gases: $G = (PCf - PCa) / (MFf \times MSf) \times 10000$. Em que: G = perdas por gases (%MS); PCf = Peso do silo cheio vedado no fechamento (kg); PCa = Peso do silo aberto (kg); MFf = Massa de forragem (kg); MSf = Concentração de MS da forragem (%).

Para perdas por efluentes: $E = [(PVf - Tb) - (PVi - Tb)] / MFi \times 1000$. Em que: E = perdas por efluentes (kg/t MF); PVi = Peso do balde vazio + peso da areia na vedação (kg); PVf = Peso do balde vazio + peso da areia na abertura (kg); Tb = Peso do balde vazio (kg); MFi = Massa de forragem na vedação (kg).

A taxa de recuperação de matéria seca foi determinada pela diferença entre os pesos dos silos à ensilagem e na abertura. A estimativa de recuperação de matéria seca foi calculada de acordo com a equação proposta por Zanine et al. (2010):

$RMS = (MFa \times MSa) / (MFf \times MSf) \times 100$. Em que: MS = Taxa de recuperação de matéria seca (%); MFa = Massa de forragem na abertura do silo (kg); MSa = Concentração de matéria seca da forragem na abertura do silo (%); MFf = Massa de forragem na vedação do silo (kg); MSf = Concentração de matéria seca da forragem na vedação do silo (%).

Análises Laboratoriais

Antes da ensilagem, coletou-se uma amostra da planta de milho inteira e quantificou-se teor de matéria seca (MS), pH, composição bromatológica, populações de bactérias ácido lácticas (BAL) e leveduras (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química e populações microbianas da planta de milho antes da ensilagem.

Matéria Seca (g/kg)	262,49
pH	5,50
Proteína Bruta (g/kg MS)	49,05
Matéria Mineral (g/kg MS)	32,34
Fibra em Detergente Neutro* (g/kg MS)	548,34
Carboidratos Solúveis Totais (g/kg MS)	152,14
BAL (log ufc/g)	5,50
Leveduras (log ufc/g)	4,30

*Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas

O teor de MS das amostras (aproximadamente 200g) foi determinado em estufa de aeração forçada a 60°C por 48 horas e, subsequente, em estufa a 105°C durante 2 horas.

A determinação do pH em água destilada ocorreu em duplicata, coletando-se aproximadamente 25 g de amostra do material ensilado de cada tratamento e adicionado 100 ml de água. Após 1 hora, realizou a leitura, de acordo com a metodologia descrita por Bolsen et al. (1992), com potenciômetro.

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal e Avaliação de Alimentos do CCA/UFPB. Para análises de composição bromatológica, utilizaram-se metodologias preconizadas pela AOAC (1990) para matéria seca (Método 967.03), para matéria mineral (Método 942.05), para proteína bruta (Método 981.10), com adaptações de Detmann et al. (2012). Para a determinação de fibra em detergente neutro (FDN) foi utilizada a metodologia preconizada por Van Soest (1991).

Para se determinar a concentração de carboidratos solúveis totais (CST), utilizou-se o método do ácido sulfúrico concentrado, descrito por Dubois et al. (1956). Para a extração, 100 mg de amostra seca e moída foram adicionadas a 100 mL de solução de etanol a 80% e colocada em aparelho de banho-maria a 80°C durante 30 minutos. Posteriormente, o material foi filtrado, o resíduo sólido descartado e completou-se o volume para 500 mL com água destilada em balão volumétrico e homogeneizado o extrato etanólico. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 2 mL do extrato etanólico, adicionou-se 1 mL de solução de fenol a 5% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Construiu-se uma curva padrão com concentrações crescentes de solução de glicose a 0,01%, conduzindo-se as leituras em espectrofotômetro a 490 nm de absorbância. Os teores de CST foram calculados em g x100 mL⁻¹, com base na solução e posteriormente, ajustado com base na matéria seca de cada amostra utilizada.

Uma porção de cada amostra coletada destinou-se à análise de ácidos orgânicos e etanol, segundo Kung Jr e Ranjit (2001): 10 g de amostra foram diluídas a 10% em água destilada, acidificada com H₂SO₄ a 50% e filtradas em papel de filtro tipo Whatman. Em 2 ml do filtrado, adicionou-se 1 ml de ácido metafosfórico a 20% e 0,2 ml de ácido fênico a 0,1%. As amostras foram centrifugadas e,

posteriormente, procedeu-se às análises dos ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico e butírico) e etanol por cromatografia líquida de alta resolução em cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC), da marca SHIMADZU, detector modelo SPD-10^a VP acoplado ao detector ultravioleta (UV), utilizando-se um comprimento de ondas de 210 nm.

A avaliação microbiológica foi realizada de acordo com as recomendações de González e Rodrigues (2003), coletando-se 25 g de amostra fresca de silagens extraídas conforme os períodos de abertura definidos. Foram adicionados 225 mL de solução de ringer estéril e processados em liquidificador por aproximadamente 1 minuto. Retirou-se 1 mL da mistura e se pipetou com a devida diluição (10⁻¹ a 10⁻⁹).

O plaqueamento foi realizado em duplicata para cada meio de cultura. As populações foram determinadas pela técnica seletiva de culturas em meio anaeróbio, onde se utilizou: o meio MRS para contagem de lactobacilos (após incubação de 48 horas em estufa à temperatura de 37° C) (MAN et al., 2003); o meio Ágar BDA (Batata Dextrose Ágar) acidificado com ácido tartárico a 1%, para contagem de leveduras (após 5 dias de incubação à temperatura ambiente) (PRESTSCHER et al., 2018). As placas consideradas susceptíveis à contagem foram aquelas em que houve valores entre 30 e 300 UFC (unidade formadora de colônia) em uma placa de Petri. Consideraram-se então as médias das placas da diluição selecionada.

A estabilidade aeróbia das silagens de milho (com abertura aos 70 dias) foi determinada através da coleta de amostras de aproximadamente 2 ± 0.03 kg de silagem de cada silo. As amostras foram realocadas em silos limpos sem compactação e a temperatura interna da massa de silagem foi verificada a cada 1 hora, por meio de termômetro digital de imersão. A temperatura ambiente foi registrada a partir de um termômetro suspenso no ar. A estabilidade aeróbia foi calculada como o número de horas antes da temperatura da massa da silagem atingir 2°C acima da temperatura ambiente (TAYLOR e KUNG JR, 2002).

Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

Neste experimento utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (representados pelos níveis de ureia 0,0; 0,5; 1,0; 2,0%) e cinco

repetições por tratamento. As contagens das populações microbianas foram transformadas em log10 para obter distribuição normal de dados.

Os dados foram analisados usando-se o PROC GLM do Software SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC) e submetidos à análise de variância e regressão. Adotou-se como critério para escolha dos modelos de regressão, a significância dos parâmetros estimados pelos modelos e os valores dos coeficientes de determinação.

Os resultados encontrados no ensaio de estabilidade aeróbia das silagens de milho não foram analisados em regressão devido às silagens aditivadas a partir de 1% de ureia terem apresentado estabilidade aeróbia superior a 96 horas, tempo limite do ensaio de estabilidade aeróbia.

Estimaram-se os níveis de significância dos coeficientes de Correlação de Pearson para as características fermentativas, microbiológicas e de perdas das silagens de milho.

A análise de componentes principais permite agrupar a maior quantidade da informação original contida em p variáveis ($p=13$, neste estudo) em um sistema de coordenadas abrangidas por dois componentes principais (1 e 2) (HAIR et al. 2009), sendo possível plotar as variáveis em gráfico bidimensional. A análise multivariada foi processada no software STATISTICA versão 7.0 (Statsoft, 2004) e o gráfico foi gerado a partir da ferramenta MVSP trial version, versão 3.2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padrão Fermentativo e Populações Microbianas das Silagens

O padrão fermentativo das silagens de milho variou conforme a adição de ureia. Houve ajuste de modelo linear crescente ($P<0,05$) para os valores de pH das silagens (Tabela 2). A adição de ureia promoveu elevação nos valores de pH. A amônia liberada na hidrólise da ureia apresenta alta afinidade com água, resultando na formação de uma base fraca, o hidróxido de amônio (NH_4OH) (LOPES e EVANGELISTA, 2010). Esta reação química promove elevação do pH da massa ensilada. Este controle do pH é benéfico no processo fermentativo das silagens, pois

inibe o desenvolvimento de microrganismos deletérios, como leveduras, que crescem em pH mais baixo.

Tabela 2. Perfil fermentativo e populações microbianas de silagens de milho aditivadas com doses de ureia

	Doses de Ureia (% base MS)					CV (%)	Probabilidade		Equação	R ²
	0	0,5	1,0	1,5	2,0		L	Q		
pH ¹	3,50	3,50	4,08	4,06	4,12	3,56	<0001	0,1689	$\hat{y}=3,501333+0,356000x$	0,7681
AL (g/kg MS)	46,62	45,79	47,55	38,41	55,83	5,03	0,8010	0,1001	$\hat{y} = 47,10$	-
AA (g/kg MS)	28,50	15,91	21,38	11,53	18,90	4,15	0,4506	0,7220	$\hat{y} = 20,35$	-
AP (g/kg MS)	0,66	0,41	0,49	0,37	0,42	6,60	0,4770	0,1384	$\hat{y} = 0,45$	-
AB (g/kg MS)	0,39	0,38	0,38	0,33	0,29	6,83	0,0131	0,1026	$\hat{y} = 0,0412 - 0,0052x$	0,8731
ETAN (g/kg MS)	21,95	32,63	5,75	6,01	7,85	20,23	0,2303	0,1107	$\hat{y} = 14,83$	-
BAL (log UFC/g MV)	7,52	8,01	9,01	9,04	8,58	1,28	0,1400	0,0004	$\hat{y}=7,3974+2,2622x - 0,8160x^2$	0,9110
LEV (log UFC/g MV)	4,86	5,01	3,95	5,25	4,50	1,12	0,3050	0,2261	$\hat{y} = 4,71$	-

pH= potencial hidrogeniônico; MS= matéria seca; AL= ácido lático; AA= ácido acético; AP= ácido propiônico; AB= ácido butírico; ETAN= etanol; BAL= bactérias ácido lácticas; LEV= leveduras

Mesmo com a adição máxima de 2% de ureia, o pH das silagens experimentais estão dentro do intervalo encontrado por Weinberg et al (2011) em dois experimentos realizados com silagens de milho sem aditivo (3,6 a 4,0) e corroborando com Pinto et al. (2012), que verificaram valores mais altos de pH (3,95) em silagens de milho aditivadas com ureia. Concluindo-se que até a dosagem de 2,0% de ureia não há efeito negativo sobre o pH das silagens de milho.

A concentração de ácidos orgânicos nas silagens reflete o grau e o tipo de fermentação que ocorreu dentro do silo. A maior dosagem de ureia nas silagens (2,0%) apresentou maior conteúdo de ácido láctico (55,83 g/kg MS), entretanto, não houve ajuste de modelo ($P>0,05$) para esta variável, com média de 47,10 g/kg de ácido láctico nas silagens.

O ácido acético é reconhecidamente uma substância com propriedades antifúngicas, capaz de inibir o desenvolvimento de microrganismos deletérios à qualidade da silagem e, conseqüentemente, elevar a estabilidade aeróbia da massa ensilada (DANNER et al., 2003).

Não houve efeito significativo da adição de ureia sobre os valores de ácido acético das silagens estudadas ($P>0,05$), com média de 20,35 g/kg. As silagens não tratadas com ureia apresentaram valores superiores de ácido acético (28,50 g/kg MS). A alta produção de ácido acético nestas silagens pode ser reflexo da maior atividade de bactérias ácido lácticas heterofermentativas.

As concentrações de ácido propiônico das silagens não obtiveram efeito da adição de ureia ($P<0,05$), com média de 0,45 g/kg MS. As silagens não tratadas com ureia apresentaram 0,66 g/kg MS de ácido propiônico, enquanto as silagens aditivadas com ureia tiveram concentrações próximas a 0,4 g/kg MS.

Houve ajuste de modelo linear decrescente para os valores de concentração de ácido butírico ($P<0,05$). O aumento gradativo da ureia na ensilagem de milho promoveu ação antibacteriana e reduziu as concentrações de ácido butírico nas silagens. Os valores para o conteúdo de ácido butírico encontrado nas silagens estudadas foram baixos (0,39 a 0,29 g/kg MS). Considerando-se o pH ácido de todas as silagens estudadas, era esperado este resultado, uma vez que os microrganismos produtores deste ácido se desenvolvem em meios com pH próximos de 6,0. A reduzida concentração de ácido butírico indica melhor qualidade higiênica das silagens (DANNER et al., 2003).

Não houve ajuste de modelo para os valores de concentração de etanol nas silagens ($P>0,05$), com média de 14,83 g/kg MS. Contudo, as silagens não tratadas e tratadas com até 0,5% de ureia tiveram os maiores valores verificados (21,95 e 32,63 g/kg MS, respectivamente).

As plantas possuem microbiota autóctone e o desenvolvimento de cada população de microrganismo depende das condições encontradas na massa ensilada (SANTOS et al., 2010). As plantas de milho apresentaram populações iniciais de bactérias ácido lácticas (BAL) de 5,50 UFC/g forragem e 4,30 UFC/g forragem de leveduras.

De acordo com McDonald et al. (1991), o número de bactérias lácticas necessário para que ocorra acentuada queda do pH na massa ensilada é de cerca de 8,0 log UFC/g, sendo possível encontrar estes valores após 14 dias de fermentação de silagens de milho (POZZA et al., 2011).

Para as populações de bactérias lácticas das silagens, houve ajuste de modelo quadrático ($P<0,05$), onde o nível de adição de 1,39% de ureia resultou no ponto máximo de crescimento de bactérias lácticas.

As espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* crescem em temperaturas que variam de 2 a 53°C, com valores médios ótimos de 30 a 40°C. São acidúricos, com pH ideal para desenvolvimento na faixa de 5,5 e 6,2, podendo o crescimento também persistir em meio com pH abaixo de 5,0 (MACEDO et al., 2008). A adição de ureia beneficiou o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas nas silagens ao manter o pH mais elevado, quando comparado às silagens não tratadas com ureia. Contudo, a adição de ureia acima de 1,39% reduziu a dinâmica de crescimento das bactérias lácticas.

Para as populações de leveduras, não houve ajuste de modelo ($P>0,05$), contudo, apresentando valor médio de 4,71 log UFC/g forragem nas silagens de milho.

As leveduras são microrganismos capazes de converter carboidratos solúveis e ácido láctico em etanol, ocasionando perdas elevadas no processo fermentativo da silagem e celeridade na deterioração aeróbia quando estas são expostas ao ar (WEINBERG et al., 2011). A diminuição destas populações pode afetar positivamente o valor nutritivo (redução de perdas de nutrientes) e a estabilidade aeróbia das silagens.

A conversão de ureia em amônia na massa ensilada beneficia o processo fermentativo das silagens. A ureia possui ação fungistática no metabolismo das

leveduras, que são microrganismos auxotróficos, dependendo estritamente da disponibilidade de uma combinação específica entre fontes de carbono e fontes de nitrogênio para se desenvolverem (VANDERSLUIS et al., 2014). Ainda, de acordo com Hess et al. (2006), o aumento da concentração de amônio é tóxico às leveduras, obrigando-as a modificarem o metabolismo de nitrogênio, incorporando o amônio na formação e excreção de aminoácidos como a glutamina ou glutamato, na presença de teores adequados de potássio. Entretanto, as populações de leveduras das silagens estudadas não tiveram efeito da adição de ureia.

Perdas Fermentativas das Silagens

No processo de ensilagem, há perdas advindas da produção de água, gás e calor, durante a fase fermentativa, além de efluentes (VAN SOEST, 1994). Neste estudo, as perdas por gases e recuperação de matéria seca tiveram ajuste de modelo quadrático ($P > 0,05$), enquanto, os valores de perdas por efluentes tiveram ajuste de modelo linear (Tabela 3).

O ponto máximo de perdas por gases foi verificado quando se adiciona 0,78% de ureia na ensilagem do milho. Os valores médios verificados para perdas por gases nas silagens estudadas foram 2,70% MS, valores inferiores àqueles encontrados por Vieira et al. (2017), que ao avaliarem efeitos da aplicação de ureia em silagens de milho com alta concentração de carboidratos solúveis, observaram efeito linear decrescente da ureia sobre as perdas, reduzindo-se as perdas de 6,32% para 2,77% MS, para as doses de 0,5 a 2,0% ureia, respectivamente.

Houve efeito linear decrescente dos níveis de aplicação de ureia sobre os valores de perdas por efluentes nas silagens de milho ($P < 0,05$), com redução de 16,00 kg/ton MN para 10,90 kg/ton MN, em silagens não tratadas e silagens tratadas com 2,0% ureia, respectivamente.

As perdas por efluentes encontradas nas silagens de milho tratadas e não tratadas com ureia foram inferiores a resultados verificados por Vieira et al. (2017), que avaliaram silagens de milho doce com 21% de MS e observaram valores acima de 70 kg/ton MN. A maior produção de efluentes nas silagens pode estar relacionada com o menor conteúdo de MS da forrageira ensilada.

Tabela 3. Perdas e recuperação de matéria seca de silagens de milho aditivadas com doses de ureia

Perdas	% Ureia					CV (%)	Média	Probabilidade		Equação	R ²
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0			L	Q		
PG (% MS)	2,67	2,92	2,12	2,70	2,30	25,82	2,70	0,4940	0,0121	$\hat{y} = 2,6826 + 0,6790x - 0,4362x^2$	0,9977
PE (kg/ton MN)	16,00	15,40	10,90	10,80	10,90	1,67	13,74	<0001	0,0060	$\hat{y} = 16,2237 - 1,0866x$	0,8206
RMS (%)	94,61	95,10	96,14	95,10	94,86	0,63	95,37	0,1895	0,0472	$\hat{y} = 94,8301 + 2,5055x - 1,3062x^2$	0,7282

MN = matéria natural; MS= matéria seca; PG= perdas por gases; PE= perda por efluentes; RMS = recuperação de matéria seca

Os valores de recuperação de matéria seca das silagens tiveram ajuste de modelo quadrático ($P < 0,05$), com ponto máximo de recuperação de MS quando aplicado 0,9% de ureia na ensilagem do milho. As médias de recuperação de MS estão próximas daquelas observadas por Vieira et al. (2017) em silagens de milho aditivadas com ureia. Os autores verificaram valores médios de 88,85; 94,68; 93,32 e 97,25% de RMS para silagens tratadas com 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de ureia (com base na matéria natural), respectivamente.

Composição bromatológica

O conteúdo de matéria seca da forrageira é um dos principais fatores determinantes ao processo de ensilagem. Para que ocorra uma boa fermentação, de acordo com McDonald et al. (1991), é necessário que a forragem apresente teores de MS acima de 20%. Corroborando com este, Van Soest (1994) confirma que o maior consumo animal de silagens se verifica quando estas apresentam valores próximos de 30% MS.

A adição de ureia não interferiu no conteúdo de matéria seca ($P > 0,05$) das silagens, que apresentaram média de 279,40 g/kg de MS (Tabela 4).

Houve efeito linear crescente para as concentrações de matéria mineral (MM) das silagens ($P < 0,05$), onde os valores elevaram de 33,37 g/kg MS para 50,53 g/kg MS de MM nas silagens. O aumento gradativo do conteúdo de matéria mineral pode ter ocorrido devido a presença de impurezas na ureia utilizada, contudo, Araki et al. (2017) também verificaram acréscimos nas concentrações de MM em silagens de cana de açúcar aditivadas com ureia. Os valores encontrados variaram de 54,4 para 64,4 g/kg de MM em silagens não tratadas, e aquelas tratadas com ureia, respectivamente.

O conteúdo proteico das silagens de milho teve efeito linear crescente ($P < 0,05$), com valores médios de 82,15 g/kg PB em silagens não tratadas e 143,18 g/kg de PB em silagens tratadas com 2,0% de ureia (com base na MS).

A adição de ureia na ensilagem de forrageiras contribui para o aumento dos compostos nitrogenados das silagens de gramíneas tropicais, sugerindo incorporação de parte do nitrogênio aplicado (OLIVEIRA et al., 2007). A incorporação do nitrogênio aplicado na forma de ureia elevou 61,03 g/kg MS quando adicionado 2% de ureia na ensilagem de milho, isso corresponde a um aumento de 74,29% do teor de nitrogênio presente nas silagens não tratadas com ureia.

Tabela 4. Composição bromatológica de silagens de milho aditivadas com diferentes doses de ureia

	Doses de Ureia (% base MS)						Probabilidade		Equação	R ²
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	CV (%)	L	Q		
MS (g/kg)	270,80	311,20	282,46	296,06	224,93	2,69	0,5273	0,0522	$\hat{y} = 279,40$	-
MM (g/kg MS)	33,37	33,79	37,86	39,99	50,53	12,44	<0001	0,3893	$\hat{y} = 34,508 + 0,4293x$	0,7392
PB (g/kg MS)	82,15	108,98	111,51	139,93	143,18	8,51	<0001	0,0017	$\hat{y} = 104,7957 + 0,8923x$	0,9209
FDNcp (g/kg MS)	494,80	502,72	475,12	444,45	420,60	6,35	0,0150	0,9514	$\hat{y} = 507,6202 - 3,2239x$	0,7604
CHOS (g/kg MS)	80,42	75,72	87,19	103,32	72,54	7,25	0,2170	0,2600	$\hat{y} = 84,89$	-

MS= Matéria seca; MM= Matéria mineral; PB= Proteína bruta; FDNcp= Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteínas; CHOS= carboidratos solúveis totais.

CV(%) = Coeficiente de variação; L = probabilidade para efeito linear; Q = probabilidade para efeito quadrático.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com aqueles observados por Sariçiçek e Kiliç (2009), que detectaram aumento de 71,63% no conteúdo proteico de silagens de milho aditivadas com 1% de ureia.

Considerando-se um sistema de alimentação de ruminantes, a elevação das frações nitrogenadas podem beneficiar a fermentação ruminal e promover maior síntese de proteína microbiana (OLIVEIRA et al., 2007). A incorporação de nitrogênio na massa ensilada fornece amônia extra em dietas com baixo teor proteico (SUGIMOTO et al., 2007).

A maior disponibilidade de proteína degradável no rúmen (PDR) é uma das razões pelo qual também se utiliza ureia em silagens de milho. A silagem de milho é uma excelente forragem para ruminantes por seu alto teor de energia digestível, entretanto, apresenta baixo teor proteico (SARIÇIÇEK e KILIÇ, 2009). O aumento da concentração de PDR pode elevar a síntese de proteína microbiana no rúmen e beneficiar o animal (NRC, 2001).

Houve efeito linear decrescente para as concentrações de FDN nas silagens ($P < 0,05$). Os valores reduziram de 494,80 g/kg FDN em silagens não tratadas para 420,60 g/kg FDN em silagens aditivadas com 2,0% de ureia.

A redução no teor de FDN das silagens foi observada em diferentes trabalhos (PEDROSO et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; RIBEIRO et al., 2010). Ribeiro et al. (2010) relataram redução significativa em silagens de cana de açúcar tratadas com 4% de ureia (valores médios de 74,5% de FDN em silagens não tratadas e 66,9% de FDN em silagens tratadas com ureia).

A ureia pode atuar sobre a fração fibrosa da massa ensilada a partir de reações de ureólise, que consiste numa reação enzimática onde ocorre a liberação da amônia através da hidrólise da ureia e reação de amoniólise, entre a amônia e as ligações do tipo éster existentes entre cadeias de hemicelulose e entre os grupos de carboidratos ou moléculas de carboidratos e lignina, resultando na formação de uma amida (WILLIAMS et al., 1984; FADEL et al., 2003; NEUMANN et al., 2010). A amoniólise provoca uma lise nas ligações entre os carboidratos estruturais, liberando-os (TARKOW e FEIST, 1969).

Ainda, a amônia apresenta alta afinidade com a água resultando na formação de uma base fraca, o hidróxido de amônio (NH_4OH). A alta afinidade da amônia com a água promove expansão da parede celular e ruptura dos componentes dos tecidos de

forragens aditivadas com ureia. Através de estudos específicos de microscopia eletrônica, pode-se constatar essa alteração da parede celular (ROSA e FADEL, 2001).

Não houve efeito significativo dos níveis de ureia para as concentrações de carboidratos solúveis nas silagens de milho ($P>0,05$), com média de 84,89 g/kg MS nas silagens.

Ao avaliar o uso de aditivos químicos em silagens de cana de açúcar, Pedroso et al. (2008) não verificaram diferenças significativas entre as silagens não tratadas e àquelas tratadas com ureia, nas concentrações de carboidratos solúveis totais das silagens.

Correlação de Pearson e Análise de Componentes Principais das Características Fermentativas das Silagens

A determinação dos coeficientes de correlação das variáveis estudadas permitiu verificar que as perdas estão associadas, de forma geral, a produção de etanol, ácido butírico e populações de leveduras.

Houve forte correlação positiva entre a concentração de ácido acético e propiônico, que por sua vez, tiveram forte correlação positiva com perdas de matéria seca.

O teor de etanol das silagens correlacionou-se positivamente com o conteúdo de ácidos acético (0,667) e butírico (0,510), e fortemente com as perdas por efluentes (0,909) e populações de leveduras (0,403). O teor de etanol correlacionou-se negativamente com as populações de bactérias lácticas (-0,803).

As leveduras são fungos capazes de deteriorar a qualidade nutritiva das forrageiras. A correlação positiva entre as populações de leveduras e conteúdo de etanol nas silagens se justifica a partir do metabolismo destes microrganismos, que em condições anaeróbias fermentam carboidratos e produzem etanol e dióxido de carbono (VANDERSLUIS et al., 2014).

As perdas por gases correlacionaram-se positivamente com as concentrações de ácidos orgânicos, principalmente ácido butírico (0,597). Os microrganismos produtores de ácido butírico convertem compostos solúveis em ácido butírico, implicando em grandes perdas neste processo.

Tabela 5. Coeficientes de correlação de Pearson das características fermentativas, microbiológicas e perdas de silagens de milho

	AL	AA	AP	ET	MS	PMS	PG	PE	RMS	pH	BAL	LEV
AB	-0,174	0,442	0,557	0,510	-0,659	-0,051	0,597	0,583	-0,072	-0,363	-0,432	-0,141
AL		0,156	0,156	0,110	-0,359	-0,007	0,328	-0,004	0,156	-0,083	-0,203	-0,432
AA			0,850	0,667	-0,526	0,339	0,291	0,827	-0,085	-0,769	-0,944	0,008
AP				0,332	-0,585	0,472	0,367	0,623	0,307	-0,480	-0,723	-0,154
ET					-0,410	-0,054	0,264	0,909	0,276	-0,842	-0,803	0,403
MS						0,033	-0,738	-0,136	-0,120	0,065	0,327	0,256
PMS							0,259	0,277	-0,714	0,027	-0,516	0,157
PG								0,210	-0,093	-0,253	-0,128	-0,274
PE									0,043	-0,834	-0,918	0,347
RMS										-0,122	0,005	0,504
pH											0,873	-0,413
BAL												-0,299

AL = ácido láctico; AA= ácido acético; AP= ácido propiônico; AB= ácido butírico; ET = etanol; MS = matéria seca; PMS = perdas de matéria seca; PG= perdas por gases; PE= perdas por efluentes; RMS= recuperação de matéria seca; BAL= bactérias ácido lácticas; LEV= leveduras.

*P<0.05.

As populações de bactérias ácido lácticas (BAL) tiveram correlação positiva com o pH (0,873). Com alto teor de carboidratos solúveis, as silagens de milho apresentaram pH ácido devido à atividade de bactérias produtoras de ácido láctico, que atuam sobre a massa ensilada reduzindo o pH e impedindo o desenvolvimento de microrganismos deletérios (McDonald et al., 1991). A correlação positiva entre o pH e o maior desenvolvimento de bactérias ácido lácticas se justifica com a dinâmica de crescimento das populações ácido lácticas, que são acidúricas, capazes de se desenvolverem em faixa de pH próximo a 4,0.

A análise de componentes principais possibilitou a construção do biplot bidimensional formado pelos dois primeiros componentes principais (Figura 1).

As variáveis experimentais com correlações positivas indicam associação da variável com as amostras localizadas à direita no eixo horizontal (CP1) e aquelas com correlações negativas indicam associação com as amostras localizadas à esquerda no eixo horizontal (CP1).

A quantidade de informação total das variáveis originais retida pelos dois componentes principais foi de 76,3% (51,26% para o primeiro componente principal, e 25,04% para o segundo componente principal). A análise de componentes principais permitiu a formação de dois grupos I e II. As variáveis que mais discriminaram no grupo I foram: matéria seca (-0,9), pH (-1,2), bactérias ácido lácticas (-0,9); enquanto, no grupo II: perdas por efluentes (1,0), etanol (1,0) ácido acético (0,8), perdas por gases (0,8).

O grupo I, incluídas as silagens aditivadas com 1,0, 1,5 e 2,0% de ureia, determinado pelas variáveis discriminantes pH, matéria seca e populações de bactérias ácido lácticas pode ser caracterizado como silagens com principal produto fermentativo ácido láctico, mesmo com valores maiores de pH. Ainda, comparativamente, as silagens tratadas com ureia apresentaram correlação negativa com variáveis como perdas por gases, perdas por efluentes e produção de etanol.

Devido às maiores quantidades de populações de bactérias ácido lácticas nas silagens tratadas a partir de 1,0% de ureia, as perdas decorrentes do processo fermentativo foram reduzidas, uma vez que a produção de ácido láctico não gera

perdas quantitativas por não haver síntese de CO₂ e outros subprodutos indesejáveis (McDONALD et al., 1991).

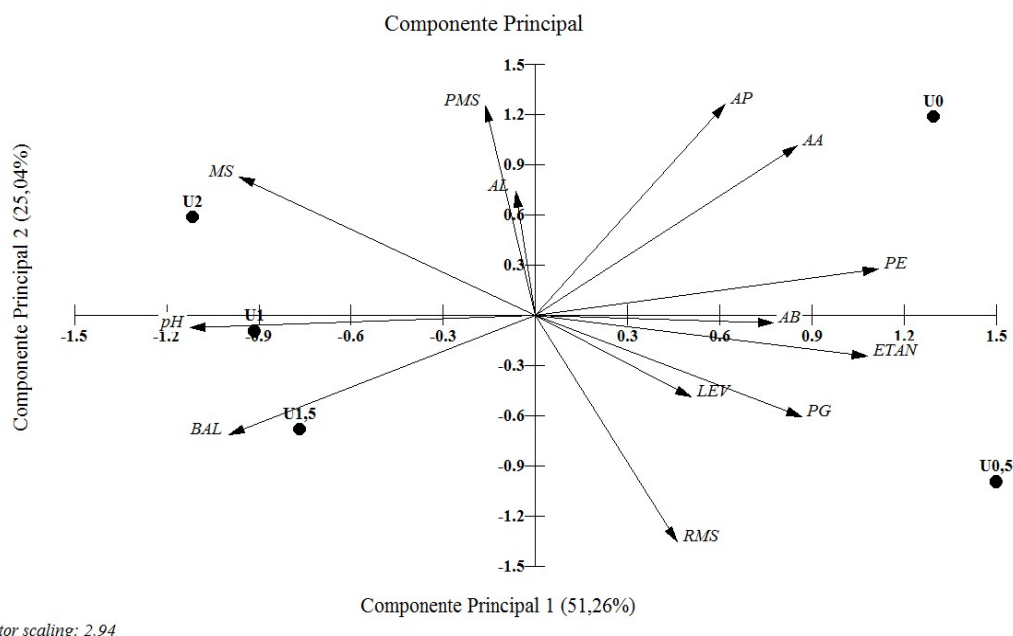


Figura 1. Distribuição das variáveis experimentais matéria seca (MS), pH, ácido láctico (AL), ácido acético (AA), ácido propiônico (AP), ácido butírico (AB), etanol (ETAN), populações de bactérias ácido lácticas (BAL), populações de leveduras (LEV), perdas de matéria seca (PMS), perdas por gases (PG), perdas por efluentes (PE) e recuperação de matéria seca (RMS) no sistema de coordenadas abrangidas pelos componentes principais 1 e 2

O grupo II, compreendido pelas silagens não tratadas ou tratadas com 0,5% de ureia apresentou discriminações relacionados à perdas e à produção de etanol e ácido acético, indicando que a fermentação principal destas silagens, provavelmente, não foi apenas láctica, gerando perdas características da atuação de outras espécies de microrganismos, como leveduras e/ou bactérias acéticas e propiônicas.

Estabilidade Aeróbia das Silagens

As reações químico-físicas e biológicas decorrentes da penetração do ar na massa ensilada, podem comprometer a qualidade higiênica da silagem, devido a maior incidência de populações de fungos (produtores de micotoxinas) (PAHLOW et al., 2003) e bactérias aeróbias (BORREANI et al., 2013); ainda, afetar o valor nutritivo (SANTOS et al., 2010), influenciar negativamente o consumo animal (GERLACH et al., 2013), e até mesmo a digestibilidade das silagens, pois o super aquecimento da massa ensilada pode provocar reação Maillard (VAN SOEST, 1994).

A estabilidade aeróbia da silagem corresponde à velocidade com que a massa ensilada deteriora após a exposição ao ar. Os principais parâmetros para se avaliar a estabilidade das silagens tem sido os valores de pH, as populações de fungos e leveduras e a elevação da temperatura da silagem (JOBIM et al., 2007).

Os valores médios de pH das silagens de milho após a exposição ao ar durante período de 96 horas não tiveram ajuste de modelo. A média geral de pH foi 4,22 (Tabela 6).

A degradação do ácido láctico nas silagens em aerobiose, resultante da atuação de microrganismos aeróbios ácido-tolerantes (DA SILVA et al., 2015), provoca aumento do pH das silagens (BORREANI et al., 2013).

Associadas com problemas de deterioração da silagem, as leveduras possuem rota fermentativa (a piruvato descarboxilase acetaldeído e subsequente redução do acetaldeído a etanol) que ocasiona grandes perdas, podendo consumir até 48,9% de matéria seca (WOOLFORD, 1990; McDONALD et al., 1991). Os valores médios de leveduras às 96 horas foram superiores nas silagens não tratadas com ureia. Estes resultados podem ser atribuídos à ação inibidora de leveduras decorrente do uso da ureia.

Tabela 6. Valores médios de pH, leveduras, temperatura máxima e estabilidade aeróbia de silagens de milho não tratadas ou tratadas com ureia

	Adição de Ureia (% MS)					CV (%)	Média	Probabilidade		Equação	R2
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0			L	Q		
pH*	4,12	4,49	4,24	4,22	4,65	6,40	4,22	0,3024	0,1406	$\hat{y} = 279,40$	-
Leveduras*	9,69	8,10	7,92	7,12	6,84	10,22	8,27	<0001	0,1070	$\hat{y} = 9,2302 - 0,9629x$	0,9455
Temperatura máxima (°C)	26,40	25,10	25,0	24,5	24,10	1,70	25,02	<0001	0,1205	$\hat{y} = 26,0600 - 1,0400x$	0,8930
Estabilidade aeróbia (h)	62	90	>96	>96	>96	1,86	88,80	-	-	-	-

*96 horas

A temperatura máxima atingida pelas silagens decresceu linearmente conforme aumento dos níveis de ureia nas silagens, o que se justifica pela redução da atividade microbiana e reações exotérmicas no silo. O tratamento das silagens com ureia melhorou a estabilidade aeróbia das silagens comparativamente às silagens não tratadas, sendo 62 horas para as silagens não tratadas e 90 a >96 horas nas silagens tratadas com ureia.

Os valores superiores encontrados para a estabilidade aeróbia das silagens de milho aditivadas com ureia podem estar associados à inibição da atividade de leveduras e consequente redução da assimilação do ácido láctico.

As leveduras geralmente são apontadas como os primeiros microrganismos deletérios às silagens expostas ao ar (DA SILVA et al., 2015), elevando a temperatura das silagens e a produção de CO₂ (LI e NISHINO, 2011). Entretanto, como a ureia possui ação tóxica a estes microrganismos, é possível que a maior resistência ao aquecimento e às mudanças nas silagens expostas ao ar tenha sido resultante da aplicação do aditivo na ensilagem de milho.

4. CONCLUSÕES

A adição de ureia afetou o padrão fermentativo das silagens, elevando-se o pH e reduzindo-se a concentração de ácido butírico das silagens. Ainda, a adição de até 1,39% de ureia promoveu aumento das populações bactérias ácido lácticas.

As perdas fermentativas tiveram efeito da adição de ureia, com redução na produção de efluentes.

A incorporação de nitrogênio à massa ensilada elevou o conteúdo de proteína bruta nas silagens e reduziu as concentrações de fibra em detergente neutro.

A adição de ureia é recomendada na ensilagem de milho devido aos seus benefícios no processo fermentativo e estabilidade aeróbia das silagens, sendo indicada a adição entre 1% a 1,5% de ureia (com base na matéria seca).

5. REFERÊNCIAS

ALONSO, V.A.; PEREYRA, C.M.; KELLER, L.A.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R.; CHIACCHIERA, S.M.; CAVAGLIERI, L.R. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, v. 115, p. 637-643. 2013.

<http://doi.org/10.1111/jam.12178>

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Arlington. AOAC, 15. ed., 1990. 500p.

ARAKI, H.C.M.; DE OLIVEIRA, E.R.; GANDRA, J.R.; DE GOES, R.H.T.B.; TAKIYA, C.S.; JACAÚNA, A.G.; OLIVEIRA, K.M.P.; VASQUES, D.N.; BRANDÃO CÔNSOLO, N.R.; DEL VALLE, T.A.; ORBACH, N.D. Association of biological and chemical additives on nutrient composition, total losses, microbiological and fermentative profile of sugarcane silage. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, v. 7, n. 4, p. 577-584. 2017.

http://journals.iau.ir/article_535722.html

BOLSEN, K.K.; LIN, C.; BRENT, C.R.; FEVERHERM, A.M.; URBAN, J.E.; AIMUTIS, W.R. Effects of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfafa and corn silages. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 3066-3083, 1992.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78070-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78070-9)

BORREANI, G.; DOLCI, P.; TABACCO, E.; COCOLIN, L. Aerobic deterioration stimulates outgrowth of spore-forming *paenibacillus* in corn silage stored under oxygen-barrier or polyethylene films. *Journal Dairy Science*. v. 96, p.5206-5216, 2013.

<http://doi.org/10.3168/jds.2013-6649>

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n. 1, p. 562-567, 2003.

<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.1.562-567.2003>

DA SILVA, T.C.; SMITH, M.L.; BARNARD, A.M.; KUNG JR, L. The effect of a chemical additive on the fermentation and aerobic stability of high-moisture corn. *Journal Dairy Science*. v. 98, p.1-12, 2015.

<http://doi.org/10.3168/jds.2015-9640>

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. Métodos para análise de alimentos. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2012. 214p.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Biochemistry*, v.28, n.3, p. 350-356, 1956.

<http://doi.org/10.1021/ac60111a017>

FADEL, R.; ROSA, B.; OLIVEIRA, I.P.; OLIVEIRA, J.D.S. Avaliação de diferentes proporções de água e de ureia sobre a composição bromatológica da palha de arroz. *Ciência Animal Brasileira*, v. 4, n. 2, p. 101-107, 2003.

<http://revistas.bvs-vet.org.br/cab/article/view/4700/3959>

FANG, J.; MATSUZAKI, M.; SUZUKI, H.; CAI, Y.; HORIGUCHI, K.; TAKAHASHI, T. Effects of lactic acid bacteria and urea treatment on fermentation quality, digestibility and ruminal fermentation of roll bale rice straw silage in wethers. *Grassland Science*, v. 58, p. 73-78. 2012.

<http://doi.org/10.1111/j.1744-697X.2012.00244.x>

FERNANDES, F.E.P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V.; PEREIRA, O.G.; CARVALHO, G.G.P.; OLIVINDO, C.S. Ensilagem de sorgo forrageiro com adição de ureia em dois períodos de armazenamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n.11, p. 2111-2115, 2009.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009001100006>

GERLACH, K.; ROB, F.; WEIB, K.; BUSCHER, W.; SUDEKUM, K. Changes in maize silage fermentation products during aerobic deterioration and effects on dry matter intake by goats. *Agricultural and Food Science*, v. 22, p. 168–181, 2013.

<https://journal.fi/afs/article/view/6739>

GONZÁLEZ, G.; RODRÍGUEZ, A.A. Effect of storage method on fermentation characteristics, aerobic stability and forage intake of tropical grasses ensiled in round bales. *Journal of Dairy Science*, v.86, n.3, p.926-933, 2003.

[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73675-3](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73675-3)

HAIR, J.F.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L. *Análise multivariada de dados*. Bookman Editora. 2009. 688p.

HESS, D.C.; LU, W.; RABINOWITZ, J.D.; BOTSTEIN, D. Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. *Plos Biology*, v. 4, n. 11, p.2012-2023. 2006.

<http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040351>

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

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982007001000013>

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

[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74575-4](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74575-4)

LI, Y.; NISHINO, N. Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *Grassland Sciences*, v. 57, p. 184-191. 2011.

<http://doi.org/10.1111/j.1744-697X.2011.00226.x>

LOPES, J. EVANGELISTA, A.R. Características bromatológicas, fermentativas e população de leveduras de silagens de cana de açúcar acrescidas de ureia e aditivos absorventes de umidade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 5, p. 984-991, 2010.

<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v39n5/07>

LOPEZ, J.; JORGENSEN, N.A.; LARSEN, H.J. et al. Effect of nitrogen source, stage of maturity, and fermentation time on pH and organic acid production in corn silage. *Journal Dairy Sciences*, v. 53, n. 9, p. 1225-1232. 1970.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86372-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86372-X)

MAN, J. D., ROGOSA, M. A.; SHARPE, M. Chapter 1 Microbiological assessment of culture media: Comparison and statistical evaluation of methods. *Progress in Industrial Microbiology*, 37, 1-23, 2003.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S. The biochemistry of silage. Marlow:Chalcombe. 2. ed. 1991. 340p.

MACEDO, L.N.; LUCHESE, R.H.; GUERRA, A.F.; BARBOSA, C.G. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 4, p. 935-942. 2008.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000400027>

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v.85, p1217-1240, 2002.

<http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC>

MIRANDA, D. C. L.; JÚNIOR, G. S. D.; LOPES, F.; PEREIRA, R. A. N.; PEREIRA, M. N. Composição e pH de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químicos e microbiológicos. *Revista de Ciências Agrárias*, v.54, n.2, p.122-130, 2011.

<https://dx.doi.org/10.4322/rca.2012.005>

NEUMANN, M.; OLIBONI, R.; OLIVEIRA, R.M.; FARIA, M.V.; UENO, R.K.; REINERH, L.L.; DURMAN, T. Aditivos químicos utilizados em silagens. *Pesquisa aplicada & Agrotecnologia*, v. 3, n. 2, 2010.

<http://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/viewFile/1155/1230>

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

OLIVEIRA, A.C.; PIRES, A.J.V.; OLIVEIRA, H.C.; PATÊS, N.M.S.; FONCÊCA, M.P.; CARVALHO, G.G.P.; NETO, U.M.; OLIVEIRA, U.L.C.; AGUIAR, L.V.; OLIVEIRA, A.B. Composição nitrogenada de silagens de gramíneas tropicais tratadas com ureia. *Archivos de Zootecnia*, v. 56, n. 213, p.15-21, 2007.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2379368>

PAHLOW, G.R.E.; MUCK, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H. SPOESLTRA, S.F. Microbiology of ensiling. *Silage Science and Tecnology*. D.R Buxton, R., 2003.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; LOURES, D.R.S.; PAZIANI, S.F.; RIBEIRO, J.L.; MARI, L.J.; ZOPOLLATO, M.; SCHMIDT, P.; MATTOS, W.R.S.; HO, J. Fermentation, losses and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. *Scientia Agricola*, v. 65, n.6, p. 589-594. 2008.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162008000600004>

PRETSCHER, J.; FISCHKAL, T.; BRANSCHIEDT, S.; JÄGER, L.; KAHL, S.; SCHLANDER, M.; THINES, E.; CLAUS, H. Yeasts from Different Habitats and Their Potential as Biocontrol Agents. **Fermentation**, 4, 31, 2018.

PINTO, A.P.; MIZUBUTI, I.Y.; RIBEIRO, E.L.A.R.; PEREIRA, E.S.; BUMBIERIS JR., V.H.; PIMENTEL, P.G.; SALMAZO, R.; CARNEIRO, M.S.S. Avaliações das silagens de bagaço de laranja e de milho com diferentes aditivos proteicos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, supl. 2, p. 3305-3314, 2012.

<http://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33Supl2p3305>

POZZA, M.S.S.; POZZA, P.C.; TSUTSUMI, C.Y.; ALMEIDA, R.Z.; NUNES, R.V.; SABEDOT, M.A.; ZAMBOM, M.A. Populações microbianas e composição química de silagem de milho. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 10, n.1, p. 91-99. 2011.

<http://dx.doi.org/10.1818/sap.v10i1.5287>

RIBEIRO, L.S.O.; PIRES, A.J.V.; CARVALHO, G.G.P. SANTOS, A.B.; FERREIRA, A.R.; BONOMO, P.; SILVA, F.F. Composição química e perdas fermentativas de silagens de cana de açúcar tratadas com ureia ou hidróxido de sódio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n.9, p. 1911-1918. 2010.

www.scielo.br/pdf/rbz/v39n9/a08v39n9.pdf

ROSA, B.; FADEL, R. Uso de amônia anidra e de ureia para melhorar o valor alimentício de forragens conservadas. *Anais do Simpósio sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas*, p. 41-63, 2001.

<http://www.nupel.uem.br/Amonia-anidra.pdf>

RUTENBERG, R.; GRANIT, R.; CHEN, Y.; POVERENOV, E.; WEINBERG, Z.G. Encapsulated propionic acid as a silage additive. Israel Journal of Plant Sciences. v.63, n. 1, p.58-63, 2016.

<https://doi.org/10.1080/07929978.2016.1151291>

SANTOS, M.V.F.; GÓMEZ CASTRO, A.G.; PEREA, J.M.; GARCIA, A.; GUIM, A.; PÉREZ HERNÁNDEZ, M. Fatores que afetam o valor nutritivo das silagens de forrageiras tropicais. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.25-43, 2010.

<http://hdl.handle.net/10396/3689>

SARIÇIÇEK, Z.; KILIÇ, U. The effects of different additives on silage gas production, fermentation kinetics and silage quality. Ozean Journal of Applied Sciences, v. 2, n. 1. 2009.

https://www.researchgate.net/publication/236969084_The_Effects_of_Different_Additives_on_Silage_Gas_Production_Fermentation_Kinetics_and_Silage_Quality

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

<http://doi.org/10.3168/jds.2009-2555>

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

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982007000700027>

SPOELSTRA, S.F.; COURTIN, M.G.; VAN BEERS, J.A.C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. Journal Agriculture Science. v. 111, p.127-132, 1988.

<https://doi.org/10.1017/S0021859600082915>

STORM, I.M.L.D.; KRISTENSEN, N.B.; RAUN, B.M.L. Dynamics on the microbiology of maize silage during whole-season storage. *Journal of Applied Microbiology*, v.109, p. 1017-1026, 2010.

<http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04729.x>.

SUGIMOTO, M.; CHIBA, T.; KANAMOTO, M.; HIDARI, H.; KIDA, K.; SAITO, W. Effects of urea treatment of potato pulp and inclusion levels of potato pulp silage in supplements on digestibility and ruminal fermentation in beef steers. *Animal Science Journal*, v. 78, p. 587-595. 2007.

<http://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2007.00479.x>

TARKOW, H., FEIST, W.C. A mechanism for improving the digestibility of lignocelulosic material with dilute alkali and liquid ammonia. *Advanced Chemistry Series*, v. 26, n. 1, p. 13-21, 1969.

<http://doi.org/10.1021/ba-1969-0095.ch012>

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

[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74222-7](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74222-7)

TELLER, R.S.; SCHMIDT, R.J.; WHITLOW, L.W.; KUNG JR., L. Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal Dairy Science*, v. 95, p. 1428-1436, 2012.

<http://doi.org/10.3168/jds.2011-4610>

VANDERSLUIS, B.; HESS, D.C.; PESYNA, C.; KRUMHOL, E.W.; SYED, T.; SZAPPANOS, R.; NISLOW, C.; PAPP, B.; TROYANSKAYA, O.G.; MYERS, C.L.;

CAUDY, A.A. Broad metabolic sensitivity profiling of a prototrophic yeast deletion collection. *Genome Biology*, v. 15, p. 1-18. 2014.

<http://genomebiology.com/2014/15/4/R64>

Van SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science*, v.74, p.3583-3597, 1991.

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

VIEIRA, F.A.P.; BORGES, I.; STEHLING, C.A.V.; GONÇALVES, L.C.; COELHO, S.G.; RODRIGUES, J.A.S. Qualidade de silagens de sorgo com aditivos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n.6, p.764-772, 2004.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352004000600011>

VIEIRA, D.A.; CEZÁRIO, A.S.; VALENTE, T.N.P.; RIBEIRO, J.C.; SANTOS, W.B.R.; FERREIRA, P.R.N. Evaluation of the addition of urea or calcium oxide (CaO) on the recovery of dry matter of the by-product of sweet corn silage. *Journal of Agricultural Science*, vol. 9, n.9, p. 141-148. 2017.

<https://doi.org/10.5539/jas.v9n9p141>

WEINBERG, Z.G.; KHANAL, P.; YILDIZ, C.; CHEN, Y.; ARIELI, A. Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silages. *Grassland Science*, v. 57, p. 46-50, 2011.

<http://doi.org/10.1111/j.1744-697X.2010.00207.x>

WILLIAMS, P.E.V.; INNES, G.M.; BREWER, A. Ammonia treatment of straw via hidrolisis of urea. Effects of dry matter and urea concentration on the rate of hidrolisis of urea. *Animal Feed Science Technology*, v. 11, n. 2, p. 115-124, 1984.

[https://doi.org/10.1016/0377-8401\(84\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(84)90015-4)

WOOLFORD, M.K. A review: the detrimental effects of air on silage. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 68, p. 101-116, 1990.

<http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02554.x>

ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M.; DOREA, J.R.R.; DANTAS, P.A.S.; SILVA, T.C.; PEREIRA, O.G. Evaluation of elephant grass with addition of cassava scrapings. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.39, n.12, p.2611-2616, 2010.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001200008>

CAPÍTULO III

**EFEITO DE *Lactobacillus buchneri* E UREIA SOBRE AS PERDAS, PADRÃO
FERMENTATIVO, COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA E ESTABILIDADE
AERÓBIA DE SILAGENS DE MILHO**

Efeitos de *Lactobacillus buchneri* e Ureia Sobre as Perdas, Padrão Fermentativo, Composição Nutricional e Estabilidade Aeróbia de Silagens de Milho

RESUMO: Objetivou-se avaliar os efeitos da aplicação de inoculante liofilizado e ativado, isolado e associado com ureia, sobre as características fermentativas, perdas, composição bromatológica e estabilidade aeróbia de silagens de milho. As silagens foram tratadas com inoculante liofilizado sem e com ureia, inoculante ativado sem e com ureia, e 1% de ureia. As variáveis avaliadas foram: pH, conteúdo de ácidos orgânicos, etanol, perdas de matéria seca, perdas por gases e efluentes, recuperação de matéria seca, composição bromatológica e contagem de populações de bactérias ácido lácticas e leveduras. As silagens foram expostas ao ar durante período de 96 horas e avaliaram-se valores de pH final, populações de leveduras, médias de temperatura máxima atingidas pelas silagens e estabilidade aeróbia. Verificaram-se maiores concentrações ($P<0,05$) de ácido láctico nas silagens inoculadas com cepas de *Lactobacillus buchneri* ativas após 24 horas (57,38 g/kg). Aos 70 dias, as silagens não tratadas, aditivadas com ureia e tratadas com inoculante ativado + ureia tiveram os maiores valores de ácido láctico ($P<0,05$). As silagens não tratadas e as silagens tratadas com inoculante ativado isolado e associado com ureia tiveram significativamente os maiores conteúdos de ácido acético aos 70 dias ($P<0,05$), com valores de 28,50, 29,67 e 28,92 g/kg MS, respectivamente. Valores inferiores de etanol foram verificados, aos 70 dias, nas silagens tratadas com ureia, com inoculante liofilizado associado com ureia e inoculante ativado (21,95; 20,66 e 21,72 g/kg MS, respectivamente). Os valores médios de pH das silagens tratadas com ureia foram significativamente superiores ($P<0,05$) àqueles verificados nas silagens de milho não tratadas e silagens inoculadas. As silagens tratadas apenas com a ureia resultaram em perdas de MS significativamente inferiores às demais silagens ($P<0,05$). A inoculação com microrganismos ativos promoveu maior desenvolvimento de bactérias lácticas durante as primeiras 24 horas do processo fermentativo. As silagens tratadas com ureia apresentaram os menores valores ($P<0,05$) para as populações de leveduras. O tratamento da massa ensilada de milho com ureia (isolada ou associada ao inoculante) elevou significativamente ($P<0,05$) o teor proteico das silagens. Comparativamente às silagens de milho não tratadas, aos 70 dias de fermentação, houve acréscimo de 29,36 g/kg nos valores médios de proteína bruta. Os valores médios de temperatura das silagens inoculadas e/ou tratadas com ureia mantiveram-se abaixo de 2° C da temperatura ambiente, não sendo detectada a perda da estabilidade aeróbia para essas silagens até o período de 96 horas de aerobiose. A adição de ureia elevou o pH e conteúdo proteico das silagens de milho, além de reduzir as concentrações de ácido butírico e o número de populações de leveduras. A inoculação da massa ensilada com bactérias ativas promoveu melhorias no padrão fermentativo das silagens, com a maior produção de ácido láctico. Todos os tratamentos promoveram aumento da estabilidade aeróbia das silagens.

Palavras-chave: aditivos, deterioração aeróbia, ensilagem, inoculante, leveduras

Effects of *Lactobacillus buchneri* and Urea on Losses, Fermentative Pattern, Chemical Composition and Aerobic Stability of Corn Silages

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effects of lyophilized and activated inoculation, and associated with urea or no, on fermentation characteristics, losses, bromatological composition and aerobic stability of corn silages. The silages was treated with inoculant activated lyophilized with or without urea, activated inoculant with and without urea, and 1% of urea. The variable evaluated were: pH, organic acids and ethanol content, dry matter loss, gas and effluent losses, dry matter recovery, bromatological composition and counting of acid lactic bacteria and yeasts populations. The silages were exposed during the 96-hour period and final pH values, yeast variables, maximum temperature averages, were evaluated for silages and aerobic stability. The highest concentrations of lactic acid were found in the silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* active after 24 hours (57.38 g / kg). At 70 days, as untreated silages, additive with urea and treated with activated inoculant + urea have the highest values of lactic acid ($P < 0.05$). Untreated and treated with active inoculant with or without urea had values higher of acetic acid after 70 days ($P < 0.05$), with values of 28.50, 29.67 and 28.92 g/kg DM, respectively. The ethanol volume was verified at 70 days in the silages treated with urea, with lyophilized inoculant associated with urea and activated inoculant (21.95, 20.66 and 21.72 g / kg DM, respectively). The mean pH values of the urea - treated silages were higher ($P < 0.05$) than those observed in untreated corn silages and inoculated silages. The silages treated with urea only resulted in dry matter losses in them ($P < 0.05$). The inoculation with activated microorganisms promotes greater development of bacteria during the 24 hours of the fermentative process. Silages treated with urea with lower values for yeasts populations ($P < 0.05$). The treatment of corn mass with urea (with or without inoculant) increased the protein content of the silages ($P < 0.05$). Compared to untreated corn silage, at 70 days of fermentation, there was an increase of 29.36 g / kg in crude protein mean values. The mean values temperature of the inoculated and/or urea treated particles were kept below 2 ° C at room temperature, and aerobic stability loss was no detected for these silages up to the 96 hour aerobic period. Addition of urea increased the pH and protein of corn silages, as well as reducing the butyric acid molecules and the number of yeast members. The inoculation of the ensiled mass with active tags promoted the fermentative pattern of the silages, with higher production of lactic acid. All treatments promote increased aerobic stability of silages.

Key words: additives, aerobic deterioration, ensiling, inoculant, yeasts

1. INTRODUÇÃO

A ensilagem é uma técnica de conservação de forragens baseada na acidificação da massa de forragem em meio anaeróbio. Embora a fermentação da silagem possa ocorrer naturalmente devido a presença de bactérias lácticas na planta, a velocidade e a eficiência do processo fermentativo é variável (BLAJMAN et al., 2018).

Uma técnica que potencializa a fermentação de silagens é a inoculação com bactérias lácticas homo e heterofermentativas (HU et al., 2009; SCHMIDT e KUNG JR., 2010; OLIVEIRA et al., 2017).

Embora haja muitos resultados favoráveis ao uso de inoculantes na literatura, em estudo de meta-análise, Oliveira et al. (2017) verificaram que a aplicação de valores próximos a 10^5 ufc/g de bactérias ácido lácticas são necessários para efetivamente melhorar a qualidade da silagem.

Uma das razões para os inoculantes não promoverem os efeitos esperados pode ser a forma de aplicação dos mesmos (SANTOS et al., 2008). O método tradicional e recomendado pelos fabricantes consiste na diluição do inoculante em água no momento da ensilagem, ou seja, a aplicação do inoculante liofilizado. Entretanto, é possível que a ativação prévia destes inoculantes em meio de cultura que possibilite o crescimento de bactérias lácticas, além de permitir a aplicação das bactérias lácticas metabolicamente ativas, aumente a sua população, possibilitando a administração de quantidades de populações bacterianas elevadas, aumentando-se o seu potencial de ação.

A taxa de aplicação de inoculantes recomendada varia por região, sendo comum nos Estados Unidos 10^5 ufc/g; na Europa, 10^6 ufc/g; Ásia e países da América do Sul 10^4 ufc/g. O uso e eficácia de valores superiores na aplicação de inoculantes sobre os parâmetros de qualidade da silagem ainda não foram bem elucidados na literatura (OLIVEIRA et al., 2017).

A ativação prévia de inoculante no meio leite desnatado reconstituído (LDR), 24 horas antes da ensilagem pode promover melhorias do perfil fermentativo, redução de perdas e alterar a composição bromatológica das silagens (SANTOS et al., 2008). Ainda, a facilidade de se fazer o meio LDR (dissolução de leite em pó desnatado em água) é um ponto positivo à técnica.

Além da inoculação, diferentes aditivos químicos foram estudados objetivando-se reduzir as perdas durante a ensilagem e após a abertura do silo, melhorando a estabilidade aeróbia de silagens de milho, destacando-se a ureia (FERNANDES et al., 2009; ARAKI et al., 2017).

Aditivos químicos como a ureia promovem boa fermentação e preservação da massa ensilada, inibindo processos deletérios no silo e elevando o crescimento de bactérias ácido lácticas (VIEIRA et al., 2017). Em silagens com alta concentração de carboidratos solúveis, a ureia pode promover menores perdas fermentativas e efeito tóxico à população de leveduras e mofos (NEUMANN et al., 2010).

Além da baixa estabilidade aeróbia, silagens de milho apresentam baixas concentrações de proteína (SARIÇIÇEK e KILIÇ, 2009). A incorporação do nitrogênio não proteico da ureia à massa ensilada pode promover acréscimo proteico no valor nutritivo das silagens (SCHMIDT et al., 2007). Além disso, pesquisas indicam que o uso de nitrogênio não proteico (NNP), na massa ensilada durante o processo de ensilagem, tem prolongado a estabilidade aeróbia das silagens e elevado a concentração de proteína em forragens com baixo teor de nitrogênio (WEISS e UNDERWOOD, 2006; SARIÇIÇEK e KILIÇ, 2009).

Objetivou-se neste estudo avaliar os efeitos da aplicação de inoculante previamente ativado e/ou liofilizado, isolado e associado com ureia, sobre as perdas fermentativas, recuperação de matéria seca, características fermentativas, composição bromatológica e estabilidade aeróbia de silagens de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Ensilagem do Milho e Tratamentos

O experimento foi conduzido no Setor de Forragicultura do Centro de Ciências Agrárias (CCA), Campus II, Areia, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O híbrido de milho utilizado neste experimento foi o Ag 1051.

O milho foi cultivado na Fazenda Mata Limpa, localizada no Município de Areia, Estado da Paraíba, na microrregião do Brejo Paraibano, latitude 6°58'07" S, e longitude 35°44'03" W e altitude de 627 m. Segundo a classificação de Köppen (quente e úmido),

apresentando temperaturas médias anuais em torno de 24°C, umidade relativa do ar em torno de 80%, ocorrendo precipitação pluvial média de 1.400 mm anuais.

A colheita do milho foi realizada com idade cronológica de 97 dias, quando os grãos estavam no estágio leitoso/pastoso. O procedimento de ensilagem ocorreu no dia 09 de agosto de 2014. As plantas foram colhidas inteiras de forma manual, picadas em máquina forrageira estacionária regulada para cortar a forragem em partículas de aproximadamente 2 cm e homogeneizadas. A forragem fresca foi transportada à Unidade de Forragicultura e foram ensiladas em silos tubulares de PVC, com 15 cm de diâmetro e 40 cm de altura, conforme os tratamentos: silagem não tratada (*in natura*); silagem com inoculante liofilizado (SIL); silagem com inoculante liofilizado + 1,0% ureia (SILU); silagem com inoculante ativado (SIA); silagem com inoculante ativado + 1,0% ureia (SIAU); silagem com 1,0% de ureia (SU). A dose de ureia foi determinada com base na matéria seca da forragem.

O inoculante com cepas de *Lactobacillus buchneri* 1×10^5 ufc/g (*Lactobacillus buchneri* CNCM I - 4323, Lallemand Animal Nutrition's) foi aplicado de acordo com as recomendações do fabricante (1 g/ton de forragem). O inoculante liofilizado foi diluído em 100 ml de água destilada e aplicado uniformemente (2 ml/kg de forragem) a partir de um spray e mistura constante.

O inoculante foi pré-ativado em leite desnatado reconstituído (LDR) a 10%, 24 horas antes da ensilagem, conforme Santos et al. (2008). 10 g de leite em pó desnatado foram solubilizados em 100 ml de água destilada, adicionando-se 2 g de sacarose como fonte de energia para o crescimento microbiano. Esterilizou-se em autoclave a 120°C durante 15 minutos. Efetuou-se a inoculação conforme especificações do fabricante e crescimento da cultura em estufa a 25°C por 24 h.

Após o crescimento, realizou-se a contagem de bactérias lácticas no LDR após 24 horas e no inoculante apenas dissolvido em água, através de meio de cultura MRS (De Man et al., 1960), para *Lactobacillus ssp.* Observaram-se populações de $2,1 \times 10^8$ e $4,5 \times 10^6$ ufc/mL de bactérias ácido lácticas (BAL) no meio crescido em LDR e inoculante diluído em água, respectivamente. 10 ml de LDR com *Lactobacillus buchneri* pré-ativado foi diluído em 90 ml de água destilada. Aplicaram-se 2 ml/kg de forragem desta mistura com auxílio de spray pulverizador.

A adição de ureia correspondeu a 3,03 g de ureia/ kg de forragem fresca (1,0% de ureia com base na MS do material a ser ensilado). A ureia foi diluída em 100 mL de água destilada e aplicada homogeneamente na forragem com auxílio de um pulverizador.

Misturaram-se homogeneamente os aditivos à forragem para o enchimento dos silos experimentais. Imediatamente, foi realizada a compactação da forragem nos silos, buscando-se atingir massa específica de 600 kg/m³ de matéria verde. Os silos foram armazenados por 1, 3, 7, 14 e 70 dias a temperatura média de 24°C antes da abertura.

O ensaio foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 6 x 5, com 6 tipos de aditivos e 5 períodos de abertura (1, 3, 7, 14 e 70 dias), com cinco repetições. As contagens microbianas foram transformadas a log₁₀ para obter distribuição normal de dados.

Avaliação de perdas fermentativas e recuperação de matéria seca (RMS)

Os silos foram pesados no dia da ensilagem e após 70 dias do processo fermentativo para se estimar as perdas oriundas da fermentação. Para estimativa de perdas por gases e efluentes, utilizou-se as equações descritas por Zanine et al. (2010).

$$\text{Para perdas por gases: } G = (PCf - PCa) / (MFf \times MSf) \times 10000$$

Em que: G = perdas por gases (%MS); PCf = Peso do silo cheio vedado no fechamento (kg); PCa = Peso do silo aberto (kg); MFf = Massa de forragem (kg); MSf = Concentração de MS da forragem (%).

$$\text{Para perdas por efluentes: } E = [(PVf - Tb) - (PVi - Tb)] / MFi \times 1000$$

Em que: E = perdas por efluentes (kg/t MF); PVi = Peso do balde vazio + peso da areia na vedação (kg); PVf = Peso do balde vazio + peso da areia na abertura (kg); Tb = Peso do balde vazio (kg); MFi = Massa de forragem na vedação (kg).

A taxa de recuperação de matéria seca foi determinada pela diferença entre os pesos dos silos à ensilagem e na abertura. A estimativa de recuperação de matéria seca foi calculada de acordo com a equação proposta por Zanine et al. (2010):

$$RMS = (MFa \times MSa) / (MFf \times MSf) \times 100$$

Em que: MS = Taxa de recuperação de matéria seca (%); MFa = Massa de forragem na abertura do silo (kg); MSa = Concentração de matéria seca da forragem na

abertura do silo (%); MFf = Massa de forragem na vedação do silo (kg); MSf = Concentração de matéria seca da forragem na vedação do silo (%)

Análises Laboratoriais

Antes da ensilagem, coletou-se uma amostra da planta de milho inteira e estimaram-se a composição química e contagem de populações microbianas da planta de milho antes da ensilagem (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química e populações microbianas da planta de milho antes da ensilagem.

Matéria Seca (g/kg)	262,49
Proteína Bruta (g/kg MS)	49,05
Matéria Mineral (g/kg MS)	32,34
Fibra em Detergente Neutro* (g/kg MS)	548,34
Carboidratos Solúveis Totais (g/kg MS)	152,14
BAL (log ufc/g)	5,50
Leveduras (log ufc/g)	4,30

*Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas

A determinação do pH em água destilada ocorreu em duplicata, coletando-se aproximadamente 25 g de amostra do material ensilado de cada tratamento e adicionado 100 ml de água. Após 1 hora, realizou a leitura, de acordo com a metodologia descrita por Bolsen et al. (1992), com potenciômetro.

Uma porção de cada amostra coletada destinou-se à análise de ácidos orgânicos e etanol, segundo Kung Jr e Ranjit (2001): 10 ml de amostra foram diluídas a 10% em água destilada, acidificada com H₂SO₄ a 50% e filtradas em papel de filtro tipo Whatman. Em 2 ml do filtrado, adicionou-se 1 ml de ácido metafosfórico a 20% e 0,2 ml de ácido fênico a 0,1%. As amostras foram centrifugadas e, posteriormente, procedeu-se às análises dos ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico e butírico) e etanol por cromatografia líquida de alta resolução em cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC), da marca SHIMADZU, detector modelo SPD-10^a VP acoplado ao detector ultravioleta (UV), utilizando-se um comprimento de ondas de 210 nm.

A avaliação microbiológica foi realizada de acordo com as recomendações de González e Rodrigues (2003), coletando-se 25 g de amostra fresca de silagens extraídas conforme os períodos de abertura definidos. Foram adicionados 225 mL de solução de *ringer* estéril e processados em liquidificador por aproximadamente 1 minuto. Retirou-se 1 mL da mistura e se pipetou com a devida diluição (10⁻¹ a 10⁻⁹). O plaqueamento foi

realizado em duplicata para cada meio de cultura. As populações foram determinadas pela técnica seletiva de culturas em meio anaeróbio, onde se utilizou: o meio Ágar Rogosa para contagem de lactobacilos (após incubação de 48 horas em estufa à temperatura de 37° C); o meio Ágar BDA (Batata Dextrose Ágar) acidificado com ácido tartárico a 1%, para contagem de leveduras (após 5 dias de incubação à temperatura ambiente). As placas consideradas susceptíveis à contagem foram aquelas em que houve valores entre 30 e 300 UFC (unidade formadora de colônia) em uma placa de Petri. Consideraram-se então as médias das placas da diluição selecionada.

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal e Avaliação de Alimentos do CCA/UFPB. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel, pesadas e mantidas em estufa a 60°C por 72 horas. Em seguida, foram moídas em moinho tipo Willey, com peneira malha de 1 mm e submetidas às análises. Para análises de composição bromatológica, utilizaram-se metodologias preconizadas pela AOAC (1990) para matéria seca (Método 967.03), para matéria mineral (Método 942.05), para proteína bruta (Método 981.10), com adaptações de Detmann et al. (2012). Para a determinação de fibra em detergente neutro (FDN) foi utilizada a metodologia preconizada por Van Soest (1991).

As determinações dos teores de carboidratos solúveis foram realizadas por espectrofotometria, pelo método descrito por Dubois et al. (1956). Para a extração, 100 mg de amostra seca e moída foram adicionadas a 100 mL de solução de etanol a 80% e colocada em aparelho de banho-maria a 80°C durante 30 minutos. Posteriormente, o material foi filtrado, o resíduo sólido descartado e completou-se o volume para 500 mL com água destilada em balão volumétrico e homogeneizado o extrato etanólico. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 2 mL do extrato etanólico, adicionou-se 1 mL de solução de fenol a 5% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Construiu-se uma curva padrão com concentrações crescentes de solução de glicose a 0,01%, conduzindo-se as leituras em espectrofotômetro a 490 nm de absorbância. Os teores de CST foram calculados em $\text{g} \times 100 \text{ mL}^{-1}$, com base na solução e posteriormente, ajustado com base na matéria seca de cada amostra utilizada.

A estabilidade aeróbia das silagens de milho foi determinada a partir de amostras de aproximadamente 2 ± 0.03 kg de silagem de cada silo. As amostras foram realocadas em

silos limpos sem compactação e a temperatura interna da massa de silagem foi verificada a cada 1 hora, por meio de termômetro digital de imersão. A temperatura ambiente foi registrada através de um termômetro suspenso no ar. A estabilidade aeróbia foi calculada como o número de horas antes da temperatura da massa da silagem atingir 2°C acima da temperatura ambiente (TAYLOR e KUNG JR, 2002).

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, usando-se o PROC GLM do Software SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC), verificando a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias usando-se PROC UNIVARIATE. Quando o valor de F foi significativo ($P < 0,05$), as médias foram comparadas pelo LSMEANS, usando o teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padrão Fermentativo das Silagens

O padrão fermentativo das silagens variou significativamente entre os tratamentos nos diferentes períodos de abertura dos silos ($P < 0,05$).

A produção de ácidos orgânicos na massa ensilada reflete a qualidade fermentativa dentro do silo e o grau de atividade dos microrganismos presentes. O ácido láctico é o principal ácido orgânico envolvido na acidificação da massa ensilada. Os valores médios de ácido láctico nas silagens diferiram significativamente entre os tratamentos em todos os períodos de abertura, oscilando entre 43,24 a 71,15 g/kg MS (Tabela 2).

Após 24 horas de fermentação (dia 1), as silagens inoculadas com *Lactobacillus buchneri* ativado tiveram maior concentração ($P < 0,05$) de ácido láctico (57,38 g/kg de ácido láctico). A maior velocidade de produção de ácido láctico era previsto neste caso, devido o maior número das populações de bactérias lácticas ativas com a inoculação na massa ensilada.

A concentração de ácido láctico nas silagens não tratadas teve um ápice no 14º dia de fermentação, conforme a dinâmica fermentativa das bactérias ácido lácticas autóctones.

Entretanto, comparativamente, verificou-se efeito dos tratamentos sobre a atividade das bactérias ácido lácticas.

Tabela 2. Valores médios de concentrações de ácidos orgânicos e etanol em silagens de milho tratadas ou não com aditivo químico e microbiológico isolados e associados

(g/kg MS)	Períodos de Fermentação (dias)				
	1	3	7	14	70
Ácido Láctico (g/kg MS)					
<i>Sem tratamento</i>	43,24d	49,51bc	46,02c	57,66b	46,61ab
SIL	50,46bc	51,15abc	45,01c	49,65c	34,14d
SILU	45,76c	47,52c	47,99abc	68,01a	42,39bc
SAI	57,38a	56,01a	51,60ab	49,76c	38,56cd
SIAU	47,29bcd	54,97a	46,75bc	71,15a	46,11ab
SU	51,31b	52,75ab	52,32a	53,21bc	47,55a
Pr>F	<0001	<0001	<0001	<0001	<0001
Ácido Acético (g/kg MS)					
<i>Sem tratamento</i>	25,18b	30,49a	23,90a	22,97d	28,50a
SIL	28,34a	22,65b	21,22b	18,38e	21,89b
SILU	16,26c	21,18b	21,02bc	19,19e	15,16c
SAI	26,12b	28,95a	18,90c	25,41c	29,67a
SIAU	25,77b	17,80c	20,83bc	32,62a	28,92a
SU	25,85b	29,84a	20,03bc	28,52b	21,38b
Pr>F	<0001	<0001	<0001	<0001	<0001
Ácido Propiônico (g/kg MS)					
<i>Sem tratamento</i>	0,45c	0,51b	0,45b	0,47b	0,66a
SIL	1,0076a	0,73ab	0,77a	0,82a	0,46ab
SILU	0,66bc	0,56b	0,46b	0,51b	0,40b
SAI	0,91a	0,89a	0,50b	0,45b	0,38b
SIAU	0,80ab	0,53b	0,48b	0,46b	0,49ab
SU	0,51c	0,54b	0,44b	0,47b	0,41b
Pr>F	<0001	<0001	0,0015	0,0001	0,0026
Ácido Butírico (g/kg MS)					
<i>Sem tratamento</i>	0,35b	0,39c	0,34c	0,41a	0,39a
SIL	0,48a	0,39c	0,49a	0,46a	0,38ab
SILU	0,45ab	0,40c	0,42b	0,27b	0,27c
SAI	0,38b	0,47b	0,46ab	0,41a	0,33b
SIAU	0,44a	0,53ab	0,48a	0,43a	0,40a
SU	0,49a	0,47b	0,48a	0,43a	0,38ab
Pr>F	<0001	<0001	<0001	<0001	<0001
Etanol (g/kg MS)					
<i>Sem tratamento</i>	48,47a	30,20a	22,68b	24,77a	32,63a
SIL	41,77b	7,45c	13,69c	15,06d	26,80b
SILU	25,84e	7,27c	25,72a	15,64d	20,66c
SAI	34,19c	25,83b	9,46d	17,23cd	21,72c
SIAU	35,80c	9,62c	9,48d	20,19b	29,31b
SU	31,04d	9,53c	12,94c	19,90bc	21,95c
Pr>F	<0001	<0001	<0001	<0001	<0001

SIL= silagem de milho com inoculante liofilizado; SILU= silagem com inoculante liofilizado e ureia; SIA= silagem com inoculante ativado; SIAU= silagem com inoculante ativado e ureia; SU= silagem com ureia
Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si ($p<0,05$) pelo Teste de Tukey

Silagens tratadas com inoculante liofilizado + ureia e silagens com inoculante ativo + ureia apresentaram concentrações superiores de ácido láctico no 14º dia de ensilagem ($P < 0,05$).

Aos 70 dias de ensilagem, as silagens não tratadas, aditivadas com ureia e tratadas com inoculante ativado + ureia tiveram os maiores valores de ácido láctico ($P < 0,05$). A hidrólise da ureia, nas silagens tratadas com ureia, pode ter favorecido o maior desenvolvimento de bactérias lácticas e, conseqüentemente, elevado o teor de ácido láctico nas silagens.

O ácido acético é uma substância com propriedades antimicóticas e tem sido considerado um ácido orgânico importante, envolvido na elevação da estabilidade aeróbia das silagens (DANNER et al., 2003). A aplicação de *Lactobacillus buchneri*, bactéria capaz de produzir ácido acético além de ácido láctico (OUDE ELFERINK et al., 2001), é indicada na ensilagem de forrageiras com elevado teor de carboidratos solúveis e/ou produção expressiva de ácido láctico.

Aos 70 dias de fermentação, as silagens não tratadas e as silagens tratadas com inoculante ativado isolado e associado com ureia tiveram significativamente os maiores conteúdos de ácido acético ($P < 0,05$), com valores de 28,50, 29,67 e 28,92 g/kg MS, respectivamente. Valores superiores àqueles observados por Schmidt e Kung Jr. (2010) em silagens inoculadas com *Lactobacillus buchneri* (1,95% MS de ácido acético).

As silagens aditivadas com inoculante liofilizado associado ou não com ureia apresentaram valores inferiores de ácido acético no 14º dia de fermentação ($P < 0,05$). As bactérias da espécie *Lactobacillus buchneri* possuem crescimento lento, podendo não ser verificado efeito da inoculação antes de 45 a 65 dias (OUDE ELFERINK et al., 2001; SCHMIDT et al., 2009).

Aos 70 dias de processo fermentativo, as silagens não tratadas resultaram em valores superiores de ácido propiônico (0,66 g/kg MS) quando comparados com os teores de ácido propiônico nas silagens tratadas com ureia (0,41 g/kg MS). A adição de ureia reduziu o desenvolvimento de bactérias propiônicas a partir do potencial de ação antimicrobiana.

As silagens tratadas com inoculante liofilizado + ureia resultaram em valores inferiores de ácido butírico (0,27 g/kg MS) após 70 dias de processo fermentativo. Valores superiores foram verificados nas demais silagens.

O conteúdo de etanol nas silagens reflete, sobretudo, a atividade de leveduras na massa ensilada. Embora, bactérias lácticas heterofermentativas sejam capazes de produzir etanol e outros tipos de metabólitos (OUDE ELFERINK, et al., 2001).

Os teores de etanol nas silagens de milho não tratadas foram elevados em todos os períodos fermentativos, principalmente nos dias 1 e 70 (48,47 e 32,63 g/kg MS). A maior produção de etanol pode estar associada à alta presença de carboidratos solúveis na planta de milho, resultando em baixo pH da massa ensilada e à presença de leveduras epífitas nestas silagens, sem interferência de aditivos antifúngicos (como a ureia) ou ácido acético (produzido a partir de cepas de *Lactobacillus buchneri*).

Valores inferiores de etanol foram verificados, aos 70 dias, nas silagens tratadas com ureia, com inoculante liofilizado associado com ureia e inoculante ativado em LDR (21,95; 20,66 e 21,72 g/kg MS, respectivamente).

Os valores médios de pH das silagens tratadas com ureia foram significativamente superiores ($P < 0,05$) àqueles verificados nas silagens de milho não tratadas e silagens inoculadas (Tabela 3). A adição de ureia na massa ensilada resulta em valores de pH e teor de ácido láctico adequados para silagens, devido ao poder tampão da amônia evitando queda demasiada do pH (SARIÇIÇEK e KILIÇ, 2009).

Os valores médios de pH encontrados nas silagens tratadas com inoculante liofilizado estão próximos daqueles verificados por Hu et al. (2009) ($\text{pH} = 3,65$) em silagens de milho inoculadas com cepas de *Lactobacillus buchneri*.

Os valores de pH nas silagens de milho não tratadas e silagens inoculadas com microrganismos pré-ativados foram significativamente inferiores às demais silagens ($P < 0,05$). Possivelmente, a atividade expressiva de maior número de populações de bactérias lácticas implicou na rápida redução do pH das silagens inoculadas com bactérias ácido lácticas previamente ativadas. Como a planta de milho apresentava elevados teores de carboidratos solúveis, a atividade das bactérias lácticas presentes na massa ensilada pode ser intensificada.

Verificaram-se valores significativamente superiores ($P<0,05$) da concentração de nitrogênio amoniacal nas silagens aditivadas com ureia (isolada ou associada) em todos os períodos de abertura, quando comparadas às demais silagens. Aos 70 dias de fermentação, com valor médio mínimo de concentração de nitrogênio amoniacal de 25,64 mg/dL nas silagens tratadas com inoculante liofilizado + ureia, e valor máximo de 30,80 mg/dL de nitrogênio amoniacal em silagens tratadas com inoculante pré-ativado + ureia.

Tabela 3. Valores médios de pH e nitrogênio amoniacal de silagens de milho não tratadas e tratadas com aditivo químico e/ou biológico isolados ou associados em diferentes períodos de fermentação.

	Períodos de Fermentação (dias)				
	1	3	7	14	70
pH					
<i>Sem tratamento</i>	3,52b	3,52d	3,63bc	3,43d	3,52d
SIL	3,56b	3,81c	3,68abc	3,61bc	3,72bc
SILU	3,76a	3,96ab	3,84a	3,72ab	3,88b
SAI	3,51b	3,65cd	3,61c	3,46cd	3,66cd
SIAU	3,81a	3,96ab	3,80ab	3,81a	3,81bc
SU	3,81a	3,98a	3,78abc	3,68ab	4,09a
Pr>F	<0001	<0001	0,0003	<0001	<0001
Nitrogênio Amoniacal (mg/dL)					
<i>Sem tratamento</i>	0,60c	1,33b	3,13c	6,37bc	7,30c
SIL	1,34bc	2,18b	5,91c	8,03b	6,86c
SILU	19,38a	16,85a	26,84a	25,01a	25,64b
SIA	5,35b	1,66b	3,46c	3,87c	6,45c
SIAU	18,65a	18,66a	20,74b	23,86a	30,80a
SU	21,41a	19,58a	19,13b	22,61a	27,72ab
Pr>F	<0001	<0001	<0001	<0001	<0001
Bactérias Ácido Láticas (log ufc/g forragem)					
<i>Sem tratamento</i>	8,43c	8,62c	8,70d	7,95c	7,52b
SIL	8,64c	8,60c	9,51c	8,29b	9,15a
SILU	9,20b	9,69b	8,77d	8,13bc	8,91a
SIA	11,00a	10,90a	11,60a	8,82a	8,94a
SIAU	8,44c	8,47c	10,48b	7,97bc	8,95a
SU	8,39c	8,36c	8,66d	7,90c	9,01a
Pr>F	<0001	<0001	<0001	<0001	<0001
Leveduras (log ufc/g forragem)					
<i>Sem tratamento</i>	5,51a	5,27a	5,41	5,65	4,86b
SIL	5,33a	5,27a	5,54	5,96	4,65b
SILU	5,37a	5,43a	5,76	5,99	4,65b
SIA	5,16a	5,47a	5,24	5,57	5,17a
SIAU	3,28b	5,04ab	5,72	5,61	4,70b
SU	3,12b	4,85b	5,49	5,79	3,95c
Pr>F	<0001	<0001	0,0634	0,7845	<0001

SIL= silagem de milho com inoculante liofilizado; SILU= silagem com inoculante liofilizado e ureia; SIA= silagem com inoculante ativado; SIAU= silagem com inoculante ativado e ureia; SU= silagem com ureia
Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si ($p<0,05$) pelo Teste de Tukey

O nitrogênio amoniacal é formado a partir da ação de microrganismos específicos, na qual a concentração desse metabólito reflete a amplitude da atividade dessas colônias em meios favoráveis ao seu crescimento no interior do silo (VAN SOEST, 1994). Sendo assim, o teor de nitrogênio amoniacal representa a degradação proteica durante a fase fermentativa, devido as fermentações secundárias na silagem, indicando as perdas de proteína verdadeira (NEUMANN et al., 2007), que seria efetivamente utilizada no metabolismo animal.

Silagens consideradas de baixa qualidade apresentam degradação proteica elevada. De acordo com McDonald et al. (1991), níveis de amônia superiores a 20%, com base na matéria seca, indicam silagem mal preservada. Entretanto, esta premissa não se aplica a silagens tratadas com ureia, uma vez que há formação de amônia na massa ensilada a partir do processo de hidrólise da ureia, elevando o conteúdo de nitrogênio amoniacal.

Não houve diferença significativa no conteúdo de nitrogênio amoniacal ($P>0,05$) entre as silagens não tratadas e inoculadas. Baixas concentrações de nitrogênio amoniacal podem ser indicador de maior fermentação homolática nas silagens (HU et al., 2009).

A fermentação homolática tende a predominar na massa ensilada. De acordo com McDonald et al. (1991), o número de bactérias lácticas necessário para que ocorra acentuada queda do pH na massa ensilada é de cerca de 8,0 log UFC/g forragem, sendo possível encontrar estes valores após 14 dias de fermentação de silagens de milho (POZZA et al., 2011).

As plantas de milho possuíam populações iniciais de bactérias ácido lácticas (BAL) de 5,50 log UFC/g forragem (Tabela 1). Após 24 horas de fermentação, todas as silagens tiveram populações de bactérias lácticas acima de 8,0 log UFC/g forragem (Tabela 4), com valores significativamente superiores de 11,0 log UFC/g forragem nas silagens tratadas com inoculante ativo ($P<0,05$). A inoculação com microrganismos ativos promoveu maior desenvolvimento de bactérias lácticas durante as primeiras 24 horas do processo fermentativo.

Aos 70 dias de ensilagem, as populações de bactérias lácticas estabilizaram em valores médios entre 8,91 e 9,15 log UFC/g forragem nas silagens tratadas. Enquanto nas

silagens não tratadas, verificaram-se valores significativamente inferiores de 7,52 log UFC/g forragem ($P < 0,05$).

Hu et al. (2009), ao avaliarem o efeito da inoculação de silagens de milho com *Lactobacillus buchneri*, verificaram valores de 9,27 log ufc/g forragem para populações de bactérias ácido lácticas e 4,03 log ufc/g forragem de leveduras.

As silagens tratadas com ureia apresentaram os menores valores ($P < 0,05$) para as populações de leveduras (Tabela 4). Após 24 horas do processo fermentativo, observou-se redução nas populações de leveduras em silagens tratadas com inoculante ativado + ureia (3,28 log ufc/g forragem) e silagens com ureia (3,12 log ufc/g forragem), quando comparados com as populações iniciais da planta.

Aos 70 dias de fermentação, as silagens tratadas com ureia diferiram significativamente das demais silagens ($P < 0,05$), com valores de populações de leveduras inferiores (3,95 log ufc/g forragem). Valores significativamente superiores (5,17 log ufc/g forragem) foram verificados em silagens inoculadas com *Lactobacillus buchneri* previamente ativado.

As leveduras são microrganismos auxotróficos, capazes de se multiplicarem rapidamente em condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Entretanto, na ausência de substratos ou pH preferenciais, as leveduras podem reduzir significativamente seu crescimento, dependem estritamente da disponibilidade de uma combinação específica entre fontes de carbono e fontes de nitrogênio (VANDERSLUIS et al., 2014).

A conversão de ureia em amônia na massa ensilada atua sobre o pH das silagens, elevando-o a uma faixa ótima para o desenvolvimento de bactérias lácticas, impedindo assim o crescimento de microrganismos indesejáveis às silagens (MIRANDA et al., 2011; ARAKI et al., 2017).

A ureia também possui ação fungistática no metabolismo das leveduras e constitui fonte pobre de nitrogênio para as leveduras (VANDERSLUIS et al., 2014). Logo, a aplicação de ureia na ensilagem promove o aumento da concentração de amônia na massa ensilada, retardando o desenvolvimento das leveduras, uma vez que promove desbalanço na relação específica de substratos para o crescimento de leveduras.

Ainda, de acordo com Hess et al. (2006), o aumento da concentração de amônio é tóxico às leveduras, obrigando-as a modificarem o metabolismo de nitrogênio,

incorporando o amônio na formação e excreção de aminoácidos como a glutamina ou glutamato, na presença de teores adequados de potássio.

A resistência à queda brusca do pH, associada à ação antifúngica, promove a redução de perdas associadas à produção de gases e efluentes em silagens (VIEIRA et al. 2017).

Perdas Fermentativas e Recuperação de MS das Silagens

As perdas durante o processo fermentativo das silagens podem ser quantificadas através do desaparecimento da MS ou energia, sendo as principais fontes de perdas oriundas dos processos bioquímicos e microbiológicos na massa ensilada, como a respiração residual, tipo de fermentação no interior do silo, produção de efluentes e gases e atividade de microrganismos indesejáveis (SANTOS et al., 2008).

Neste ensaio, todas as silagens tiveram baixos índices de perdas fermentativas, o que indica que ocorreu uma boa fermentação do material ensilado. As silagens de milho não tratadas e inoculadas com bactérias liofilizadas tiveram valores de perdas de MS similares. As silagens tratadas apenas com a ureia resultaram em perdas de MS significativamente inferiores às demais silagens ($P < 0,05$) (Tabela 4). Valores superiores (5,31% de perdas totais) foram verificados por Silva et al. (2017) em silagens de milho tratadas com 1% de ureia.

Tabela 4. Perdas fermentativas e recuperação de matéria seca em silagens de milho não tratada e tratadas com ureia e inoculante isolados e/ou associados.

	Perdas Fermentativas			
	PMS (%)	PG (%MS)	PE (kg/ton MN*)	RMS (%)
<i>Sem tratamento</i>	5,38a	2,67b	16,00a	94,61c
SIL	5,07a	3,17b	16,00a	94,92c
SILU	5,17a	3,28b	15,90 ^a	94,82c
SAI	4,32bc	5,55 ^a	15,55bc	95,67ab
SIAU	4,84ab	3,91b	15,60b	95,15bc
SU	3,85c	2,92b	15,40c	96,14a
EPM	0,1950	1,9906	0,0065	0,1951
Pr>F	<0001	<0001	<0001	<0001

*MN = Matéria natural; PMS = perdas de matéria seca; PG = perdas por gases; PE = perdas por efluentes; RMS = recuperação de matéria seca; EPM = erro padrão da média SIL= silagem de milho com inoculante liofilizado; SILU= silagem com inoculante liofilizado e ureia; SAI= silagem com inoculante ativado; SIAU= silagem com inoculante ativado e ureia; SU= silagem com ureia

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey

A ureia é um aditivo capaz de atuar benéficamente no processo fermentativo das silagens, reduzindo as perdas de nutrientes através da redução da atividade de leveduras, reduzindo a fermentação alcoólica, em função da desaceleração da queda do pH das silagens, uma vez que as leveduras têm a atividade mais intensa em silagens mais ácidas (MCDONALD et al., 1991; PEDROSO et al., 2008).

As perdas por gases verificadas foram superiores ($P<0,05$) nas silagens tratadas com inoculante ativado (5,55%). As bactérias heterofermentativas são capazes de produzir ácido láctico e quantidade considerável de ácido acético. Entretanto, produzem também quantidades de etanol, CO_2 e outros metabólitos (SANTOS et al., 2013).

Os maiores valores de produção de gases nas silagens inoculadas com bactérias previamente ativadas podem ser justificados pelo metabolismo heterofermentativo destes microrganismos. Ainda, como a produção de ácido acético é lenta na massa ensilada, é possível que fungos, como as leveduras, tenham atuado de forma mais expressiva.

As silagens tratadas com inoculante ativo (SIA), com inoculante ativo + ureia (SIAU) e com ureia (SU) tiveram menores produções de efluentes ($P<0,05$) (15,55; 15,60 e 15,40 kg/ton MN, respectivamente). Os valores encontrados foram inferiores àqueles verificados por Vieira et al. (2017) em silagens de milho tratadas com 1,0 e 2,0% de ureia (70,74 e 77,73 kg/ton MN, respectivamente).

Houve diferença significativa entre a recuperação de matéria seca das silagens ($P<0,05$), destacando-se as silagens tratadas com ureia (SU), inoculante ativado (SAI) e inoculante ativado + ureia (SIAU) com os maiores percentuais (96,14%; 95,67% e 95,15%, respectivamente). Isso se justifica pela ação antimicrobiana da ureia, que reduz o desenvolvimento de leveduras na massa ensilada, e também ao maior número de populações de bactérias lácticas presentes no inoculante ativado.

Os valores de RMS encontrados foram semelhantes aos resultados observados por Schmidt e Kung Jr. (2010), 96,74% em silagens de milho inoculadas, e inferiores àqueles verificados por Hu et al. (2009), que observaram recuperação de matéria seca de 99% em silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus buchneri*.

Composição Bromatológica

Não houve efeito significativo ($P>0,05$) dos tratamentos sobre o conteúdo de matéria seca das silagens de milho em todos os períodos de abertura (Tabela 5). Os valores médios verificados estavam dentro da faixa resultante de um adequado processo fermentativo com baixa produção de efluentes (valores próximos a 30% MS), o que beneficia a disponibilidade de nutrientes ao animal (VAN SOEST, 1994).

A matéria mineral das silagens de milho estudadas não apresentou variações significativas em todos os períodos de fermentação ($P>0,05$).

O tratamento da massa ensilada de milho com ureia (isolada ou associada ao inoculante) elevou significativamente ($P<0,05$) o teor proteico das silagens. Comparativamente às silagens de milho não tratadas, aos 70 dias de fermentação, houve acréscimo de 29,36 g/kg nos valores médios de proteína bruta quando adicionado 1% de ureia na massa ensilada, ou seja, aumento de 35,27% no conteúdo proteico.

Embora a silagem de milho seja uma excelente forragem para ruminantes por seu alto teor de energia digestível, a adição de ureia na ensilagem de forrageiras contribui para o aumento dos compostos nitrogenados das silagens, sugerindo incorporação de parte do nitrogênio aplicado. Considerando-se um sistema de alimentação de ruminantes, a elevação dessas frações nitrogenadas podem beneficiar a fermentação ruminal e promover maior síntese de proteína microbiana (BOUCHER et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007)

Em estudos com silagens de cana de açúcar aditivadas, Araki et al., observaram a incorporação de nitrogênio na massa ensilada, a partir da aplicação de ureia, elevar os valores de proteína bruta de 34,5 g/kg MS para 110 g/kg MS.

Aos 70 dias de fermentação, as silagens inoculadas com bactérias ativadas tiveram valores significativamente inferiores ($P<0,05$) de proteína bruta (70,22 g/kg MS).

Para a concentração de carboidratos solúveis totais, houve diferença significativa ($P<0,05$) entre os tratamentos em todos os períodos de abertura. Nas primeiras 24 horas de fermentação, as silagens inoculadas com bactérias ativas e aquelas tratadas com inoculação ativa + ureia tiveram valores significativamente menores ($P<0,05$) de carboidratos solúveis quando comparadas com as silagens não tratadas e silagens tratadas

com inoculante liofilizado + ureia. Isso pode ser justificado pela maior presença de microrganismos ativos nestas silagens durante este período fermentativo.

Tabela 5. Composição bromatológica de silagens de milho não tratadas e tratadas com aditivo químico e/ou biológico isolados ou associados em diferentes períodos de fermentação.

	Períodos de Fermentação (dias)				
	1	3	7	14	70
Matéria Seca (g/kg)					
<i>Sem tratamento</i>	269,11	276,30	284,66	282,25	270,80
SIL	278,09	277,58	283,63	275,29	271,01
SILU	283,39	277,00	283,44	283,89	285,81
SAI	279,93	279,12	282,99	278,20	285,39
SIAU	286,19	277,77	309,91	282,07	284,52
SU	281,99	249,75	282,97	282,93	282,43
Pr>F	1,0000	0,9984	0,9998	0,6800	1,0000
Matéria Mineral (g/kg MS)					
<i>Sem tratamento</i>	35,19	39,53	36,97	35,82	33,37
SIL	39,01	44,05	45,57	42,09	36,81
SILU	36,53	42,56	40,77	39,57	40,71
SAI	37,96	39,17	40,53	38,37	43,24
SIAU	37,02	35,96	40,49	38,56	38,88
SU	35,24	35,25	34,70	41,16	37,86
Pr>F	0,9996	0,9812	0,9880	0,9977	0,9836
Proteína Bruta (g/kg MS)					
<i>Sem tratamento</i>	69,65b	68,30b	57,18b	64,48b	82,15b
SIL	63,53b	67,70b	71,84b	71,08b	88,02b
SILU	106,10a	105,96a	89,84a	106,80a	111,26a
SAI	57,59b	73,52b	59,85b	73,29b	70,22c
SIAU	108,98a	99,65a	99,05a	106,55a	111,10a
SU	111,51a	98,20a	103,46a	114,25a	111,50a
Pr>F	<0001	<0001	<0001	<0001	<0001
Carboidratos Solúveis (g/kg MS)					
<i>Sem tratamento</i>	110,45a	61,93b	58,84b	68,20b	67,09b
SIL	100,66ab	55,87b	63,86ab	79,16b	89,68a
SILU	110,82a	72,85ab	80,96a	78,29b	86,32a
SAI	98,18ab	96,23a	84,23a	75,34b	86,25a
SIAU	81,63b	60,35b	71,61a	90,88a	84,19a
SU	90,82ab	63,86b	68,54a	86,15a	87,19a
Pr>F	0,0140	0,0004	<0001	0,0084	0,0165
Fibra em Detergente Neutro* (g/kg MS)					
<i>Sem tratamento</i>	511,49	530,49	517,90	528,74	494,82
SIL	496,15	539,47	508,93	505,23	498,15
SILU	474,40	474,58	499,46	490,33	502,74
SAI	498,28	520,04	488,18	496,04	505,55
SIAU	471,76	492,17	512,30	501,89	470,89
SU	475,12	487,73	498,47	501,96	475,12
Pr>F	0,4225	0,0344	0,8187	0,6595	0,5513

*Corrigida para cinzas e proteínas

SIL= silagem de milho com inoculante liofilizado; SILU= silagem com inoculante liofilizado e ureia; SIA= silagem com inoculante ativado; SIAU= silagem com inoculante ativado e ureia; SU= silagem com ureia. Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si ($p<0,05$) pelo Teste de Tukey.

As silagens tratadas com ureia apresentaram valores elevados de carboidratos solúveis em todos os períodos de fermentação. Aos 70 dias, as silagens de milho não tratadas tiveram o menor conteúdo de carboidratos solúveis (67,09 g/kg MS) quando comparada àquelas que foram aditivadas (>80 g/kg MS).

Para o conteúdo de FDN das silagens, embora várias pesquisas indiquem efeito da adição de ureia sobre a fração fibrosa das forragens, não houve efeito significativo ($P>0,05$) dos tratamentos sobre o conteúdo de FDNcp nas silagens de milho.

Estabilidade Aeróbia

A presença de oxigênio durante o período de armazenamento ou abertura do silo favorece o crescimento de microrganismos aeróbios. O desenvolvimento destes microrganismos na massa ensilada reduz a qualidade do alimento final, implicando em valores elevados de perdas de nutrientes (POZZA et al., 2011).

Após 96 horas de exposição ao ar, as silagens de milho tratadas com inoculante liofilizado e inoculante ativo com ureia, tiveram valores de pH final significativamente superiores (Tabela 6).

As populações de leveduras encontradas nas silagens de milho não tratadas foram significativamente superiores àquelas tratadas com inoculante liofilizado + ureia, com inoculante ativo + ureia e silagens tratadas com ureia ($P<0,05$).

Tabela 6. Valores médios de pH final, populações de leveduras, temperatura máxima e estabilidade aeróbia de silagens de milho não tratadas ou tratadas com ureia e *L. buchneri* isolados e/ou associados

	Sem tratamento	Adição de Ureia (% MS)				SU	Média Geral	CV(%)	Pr>F
		SIL	SILU	SIA	SIAU				
pH final*	4,16b	4,49a	4,24b	4,22b	4,65a	3,99b	4,22	6,40	0,048
LEV*	9,69a	8,78ab	7,92b	8,57ab	7,41b	8,10b	8,27	10,22	0,002
TM (°C)	26,5a	26,0ab	25,0b	25,0b	25,5b	25,0b	25,5b	0,68	0,019
EA (h)	62	>96	>96	>96	>96	>96	96	13,36	0,030

*96 horas

LEV = leveduras; TM = valores médios de temperatura máxima; EA = estabilidade aeróbia

SIL= silagem de milho com inoculante liofilizado; SILU= silagem com inoculante liofilizado e ureia; SIA= silagem com inoculante ativado; SIAU= silagem com inoculante ativado e ureia; SU= silagem com ureia

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem entre si ($p<0,05$) pelo Teste de Tukey

A ureia atua na massa ensilada elevando os valores de pH do meio, reduzindo o potencial de desenvolvimento das populações de leveduras. Ainda, a reação de hidrólise

da ureia eleva a concentração de amônia na massa ensilada. A amônia é tóxica aos fungos, capaz de alterar o metabolismo das leveduras e retardar o seu crescimento (VANDERSLUIJS et al., 2014).

O aquecimento característico das silagens deterioradas é resultante da atividade de bactérias aeróbias que liberam calor através de reações exotérmicas, gerando aquecimento à massa ensilada. Os valores de temperatura máxima foram superiores nas silagens de milho sem tratamento ($P < 0,05$), o que indica que nestas silagens pode ter ocorrido maior grau de deterioração aeróbia.

Os valores médios de temperatura das silagens inoculadas e/ou tratadas com ureia mantiveram-se abaixo de 2° C da temperatura ambiente, não sendo detectada a perda da estabilidade aeróbia para essas silagens até o período de 96 horas de aerobiose.

O aumento da estabilidade aeróbia nas silagens tratadas pode ser justificado com a redução do crescimento de leveduras. As leveduras são apontadas como os primeiros microrganismos envolvidos na deterioração de silagens, promovendo ambiente adequado ao desenvolvimento de outros microrganismos aeróbios envolvidos na deterioração aeróbia da massa ensilada (WOOLFORD, 1990).

Hu et al. (2009) observaram valores de 53 horas de estabilidade aeróbia em silagens de milho sem tratamento, enquanto em silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus buchneri*, as silagens atingiram 112 horas de estabilidade após exposição ao ar. Resultados semelhantes foram encontrados por Kristensen et al. (2010), ao avaliar o efeito da inoculação em silagens de milho verificaram valores de estabilidade aeróbia de 88 a 100 horas em silagens inoculadas com *Lactobacillus buchneri*. Comparativamente, as silagens de milho não tratadas apresentaram perda da estabilidade aeróbia 37 horas após a exposição ao ar.

A maior disponibilidade de ácido acético a partir da inoculação com cepas de *Lactobacillus buchneri* reduz o desenvolvimento de microrganismos deletérios à silagem. A ação fungistática da ureia sobre as populações de leveduras nas silagens aumenta a estabilidade aeróbia da massa ensilada quando na fase de abertura dos silos para oferta de silagem aos animais.

4. CONCLUSÕES

A adição de ureia elevou o pH e conteúdo proteico das silagens de milho, além de reduzir as concentrações de ácido butírico e o número de populações de leveduras.

A inoculação da massa ensilada com bactérias ativas promoveu melhorias no padrão fermentativo das silagens, com a maior produção de ácido lático.

Todos os tratamentos promoveram aumento da estabilidade aeróbia das silagens.

5. REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Arlington. **AOAC**, 15. ed., 1990. 500p.

ARAKI, H.C.M.; DE OLIVEIRA, E.R.; GANDRA, J.R.; DE GOES, R.H.T.B.; TAKIYA, C.S.; JACAÚNA, A.G.; OLIVEIRA, K.M.P.; VASQUES, D.N.; BRANDÃO CÔNSOLO, N.R.; DEL VALLE, T.A.; ORBACH, N.D. Association of biological and chemical additives on nutrient composition, total losses, microbiological and fermentative profile of sugarcane silage. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 7, n. 4, p. 577-584. 2017.

http://journals.iau.ir/article_535722.html

BLAJMAN, J.E.; PÁEZ, R.B.; VINDEROLA, C.G.; LINGUA, M.S.; SIGNORINI, M.L. A meta-analysis of the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage. **Journal of Applied of Microbiology**, 2018.

<https://doi.org/10.1111/jam.14084>

BOLSEN, K.K.; LIN, C.; BRENT, C.R.; FEVERHERM, A.M.; URBAN, J.E.; AIMUTIS, W.R. Effects of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfafa and corn silages. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3066-3083, 1992.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78070-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78070-9)

BOUCHER, S.E.; ORDWAY, R.S.; WHITEHOUSE, N.L.; LUNDY, F.P.; KONONOFF, P.J.; SCHWAB, C.G. Effect of incremental urea supplementation of a conventional corn silage-based diet on ruminal ammonia concentration and synthesis of microbial protein. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. 5619-5633. 2007.

<http://doi.org/10.3168/jds.2007-0012>

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n. 1, p. 562-567, 2003.

<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.1.562-567.2003>

DA SILVA, T.C.; SMITH, M.L.; BARNARD, A.M.; KUNG JR, L. The effect of a chemical additive on the fermentation and aerobic stability of high-moisture corn. **Journal Dairy Science**. v. 98, p.1-12, 2015.

<http://doi.org/10.3168/jds.2015-9640>

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. Métodos para análise de alimentos. **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2012. 214p.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, v.28, n.3, p. 350-356, 1956.

<http://doi.org/10.1021/ac60111a017>

FERNANDES, F.E.P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V.; PEREIRA, O.G.; CARVALHO, G.G.P.; OLIVINDO, C.S. Ensilagem de sorgo forrageiro com adição de ureia em dois períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n.11, p. 2111-2115, 2009.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009001100006>

GONZÁLEZ, G.; RODRÍGUEZ, A.A. Effect of storage method on fermentation characteristics, aerobic stability and forage intake of tropical grasses ensiled in round bales. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.3, p.926-933, 2003.

[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73675-3](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73675-3)

HESS, D.C.; LU, W.; RABINOWITZ, J.D.; BOTSTEIN, D. Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. **Plos Biology**, v. 4, n. 11, p.2012-2023. 2006.

<http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040351>

HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; DANNER, H.; BRAUN, R. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. **TREND in Biotechnology**, v. 21, n. 6, p.282-287. 2003.

[http://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00106-9](http://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00106-9)

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

<http://doi.org/10.3168/jds.2008-1788>

KLEINSCHMIT, D.H.; KUNG JR., L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 3999-4004. 2016.

KOC, F.; ZKSOY, O.; OKURI, A.A.; CLIKYURT, G.; KORUCU, D.; OZDUVEN, M.L. Effect of pre-fermented juice, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* on the fermentation characteristics and aerobic stability of high dry matter alfalfa bale silage. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 27, n. 5, p. 1426-1431. 2017.

[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74912-5](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74912-5)

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

<http://doi.org/10.3168/jds.2010-3136>

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

[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74575-4](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74575-4)

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p1217-1240, 2002.

<http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC>

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

MIRANDA, D. C. L.; JÚNIOR, G. S. D.; LOPES, F.; PEREIRA, R. A. N.; PEREIRA, M. N. Composição e pH de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químicos e microbiológicos. **Revista de Ciências Agrárias**, v.54, n.2, p.122-130, 2011.

<https://dx.doi.org/10.4322/rca.2012.005>

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

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300021>

NEUMANN, M.; OLIBONI, R.; OLIVEIRA, R.M.; FARIA, M.V.; UENO, R.K.; REINERH, L.L.; DURMAN, T. Aditivos químicos utilizados em silagens. **Pesquisa aplicada & Agrotecnologia**, v. 3, n. 2, 2010.

<http://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/viewFile/1155/1230>

NEUMANN, M.; MÜHLBACH, P.R.F.; NÖRNBERG, J.L.; OST, P.R.; RESTLE, J.; SANDINI, I.E.; ROMANO, M.A. Características da fermentação da silagem obtida em diferentes tipos de silos sob efeito do tamanho de partículas e da altura da colheita das plantas de milho. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 37, n. 3, p. 847-854. 2007.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000300038>

NSEREKO, V.L.; SMILEY, B.K.; RUTHEFORD, W.M.; SPIELBAUER, A. FORRESTER, K.J.; HETTINGER, G.H.; KARMAN, E.K.; HARMAN, B.R. Influence of inoculation forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 122-135. 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.039>

OLIVEIRA, A.C.; PIRES, A.J.V.; OLIVEIRA, H.C.; PATÊS, N.M.S.; FONCÊCA, M.P.; CARVALHO, G.G.P.; NETO, U.M.; OLIVEIRA, U.L.C.; AGUIAR, L.V.; OLIVEIRA, A.B. Composição nitrogenada de silagens de gramíneas tropicais tratadas com ureia. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, n. 213, p.15-21, 2007.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2379368>

OLIVEIRA, A.S.; WEINBERG, Z.G.; OGUNADE, I.M.; CERVANTES, A.A.P.; ARRIOLA, K.G.; JIANG, Y.; KIM, D.; LI, X.; GONÇALVES, M.C.M.; VYAS, D.; ADESOGAN, A.T. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability and the performance of dairy cows. *Journal Dairy Science*, v. 100, p. 1-17. 2017.

<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11815>

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

<http://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>

PAHLOW, G.R.E.; MUCK, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H. SPOESLTRA, S.F. Microbiology of ensiling. **Silage Science and Technology**. D.R Buxton, R., 2003.

POZZA, M.S.S.; POZZA, P.C.; TSUTSUMI, C.Y.; ALMEIDA, R.Z.; NUNES, R.V.; SABEDOT, M.A.; ZAMBOM, M.A. Populações microbianas e composição química de silagem de milho. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n.1, p. 91-99. 2011.

<http://dx.doi.org/10.1818/sap.v10i1.5287>

SARIÇIÇEK, Z.; KILIÇ, U. The effects of different additives on silage gas production, fermentation kinetics and silage quality. **Ozean Journal of Applied Sciences**, v. 2, n. 1. 2009.

https://www.researchgate.net/publication/236969084_The_Effects_of_Different_Additives_on_Silage_Gas_Production_Fermentation_Kinetics_and_Silage_Quality

SANTOS, E.M.; SILVA, T.C.; MACEDO, C.H.O.; CAMPOS, F.S. Lactic acid bacteria in tropical Grass silages. In. Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purpose, p. 335-362. **Intech**. 2013.

<http://dx.doi.org/10.5772/50703>

SANTOS, E.M.; ZANINE, A.M.; FERREIRA, D.J.; OLIVEIRA, J.S.; PENTEADO, D.C.S.; PEREIRA, O.G. Inoculante ativado melhora a silagem de capim-tanzânia (*Panicum maximum*). **Archive Zootecnia**, v. 57, n. 217, p. 35-42. 2008.

<http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web>

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

<http://doi.org/10.3168/jds.2009-2555>

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

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982007000700027>

SILVA, J.; WINCKLER, J.P.P.; KRISTENSEN, N.B.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L.G. Effects of *Lactobacillus buchneri* inoculation or 1-propanol supplementation to corn silage on the performance of lactating Holstein cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 7, p. 591-598, 2017.

<http://dx.doi.org/10.1590/s1806-92902017000700006>

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

[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74222-7](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74222-7)

VANDERSLUIS, B.; HESS, D.C.; PESYNA, C.; KRUMHOL, E.W.; SYED, T.; SZAPPANOS, R.; NISLOW, C.; PAPP, B.; TROYANSKAYA, O.G.; MYERS, C.L.; CAUDY, A.A. Broad metabolic sensitivity profiling of a prototrophic yeast deletion collection. *Genome Biology*, v. 15, p. 1-18. 2014.

<http://genomebiology.com/2014/15/4/R64>

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

VIEIRA, D.A.; CEZÁRIO, A.S.; VALENTE, T.N.P.; RIBEIRO, J.C.; SANTOS, W.B.R.; FERREIRA, P.R.N. Evaluation of the addition of urea or calcium oxide (CaO) on the recovery of dry matter of the by-product of sweet corn silage. **Journal of Agricultural Science**, vol. 9, n.9, p. 141-148. 2017.

<https://doi.org/10.5539/jas.v9n9p141>

WEINBERG, Z.G.; KHANAL, P.; YILDIZ, C.; CHEN, Y.; ARIELI, A. Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silages. **Grassland Science**, v. 57, p. 46-50, 2011.

<http://doi.org/10.1111/j.1744-697X.2010.00207.x>

WEISS, B.; UNDERWOOD, J. **Silage additives**. Ohio State University Extension department of Horticulture and Crop Science. Coffey Road, Columbus, Ohio. 43210-1044, AGF -018-92. 2006.

WOOLFORD, M.K. A review: the detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 101-116, 1990.

<http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02554.x>

ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M.; DOREA, J.R.R.; DANTAS, P.A.S.; SILVA, T.C.; PEREIRA, O.G. Evaluation of elephant grass with addition of cassava scrapings. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39, n.12, p.2611-2616, 2010.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001200008>

CAPÍTULO IV

EFEITO DA INOCULAÇÃO COM *Lactobacillus buchneri* LIOFILIZADO E ATIVADO SOBRE AS POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS LÁTICAS DE SILAGENS DE MILHO

EFEITO DA INOCULAÇÃO COM *Lactobacillus buchneri* LIOFILIZADO E ATIVADO SOBRE AS POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS LÁTICAS DE SILAGENS DE MILHO

Resumo: O uso de inoculantes liofilizados e/ou ativados no processo de ensilagem pode afetar a composição microbiana e redirecionar o padrão fermentativo e a estabilidade aeróbia das silagens. Objetivou-se neste trabalho, avaliar o efeito da inoculação com *Lactobacillus buchneri* liofilizado e/ou ativado sobre as populações de bactérias lácticas de silagens de milho. Os tratamentos experimentais consistiram na ensilagem de milho sem aditivo, aditivada com inoculante liofilizado e aditivada com inoculante pré-ativado em leite desnatado reconstituído. Os silos foram armazenados durante 1, 3, 7, 14 e 70 dias. Para a quantificação das populações de bactérias lácticas utilizou-se a técnica *pour plate* em meio de cultura seletivo, Agar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe). Para a identificação bacteriana, realizou-se a análise de reação de polimerase em cadeia (PCR). As silagens inoculadas com bactérias pré-ativadas em leite tiveram picos de 11,0 log ufc/g forragem aos 7 dias de fermentação. Os isolados capturados nas silagens de milho com e sem tratamentos foram identificados, sendo que, 93% dos isolados correspondiam a bactérias lácticas da espécie *Lactobacillus plantarum*. Dentre os isolados, não se detectou bactérias da espécie *Lactobacillus buchneri*.

Palavras-chave: aditivo biológico, fermentação, identificação bacteriana.

EFFECT OF *Lactobacillus buchneri* LYOPHILIZED OR ACTIVATED INOCULATION ON POPULATIONS OF LACTIC ACID BACTERIA IN CORN SILAGE

Abstract: The use of lyophilized and/or activated inoculants in the silage process can affect a microbial composition and redirect the fermentation pattern and an aerobic stability of the silages. The objective of this work was to evaluate the effect of inoculation with lyophilized and/or activated *Lactobacillus buchneri* on populations of lactic acid bacteria from corn silages. The experimental treatments consisted in the ensilage of corn without additive; additive with lyophilized inoculant and pre-activated inoculant. The silos were stored for 1, 3, 7, 14 and 70 days. For the quantification of populations of lactic bacteria, the *pour plate* technique was used in medium of selective culture, MRS agar (De Man, Rogosa and Sharpe). For bacterial identification, polymerase chain reaction (PCR) analysis was performed. As silages inoculated with activated bacteria in reconstituted skim milk with ten peaks of 11.0 log cfu / g forage at 7 days of fermentation. The isolates captured in the corn silages with and treatments were identified, 93% of the isolates corresponding to the lactic bacteria of the species *Lactobacillus plantarum*. Among the isolates, no bacteria of the species *Lactobacillus buchneri* are detected.

Key words: biological additive, fermentation, bacterial identification.

1. INTRODUÇÃO

O processo de ensilagem está diretamente associado à natureza da comunidade microbiana epifítica, onde a diversidade bacteriana é um dos fatores determinantes do padrão fermentativo das silagens. As comunidades microbianas encontradas nas culturas forrageiras antes do processo de ensilagem diferem consideravelmente, em número e taxonomia, daquelas encontradas na silagem (PAHLOW et al., 2003).

A presença das bactérias produtoras de ácido láctico na massa ensilada predispõe à conservação da forragem a partir da sua acidificação (MCDONALD et al., 1991). As bactérias lácticas são gram-positivas, não formadoras de esporos, estritamente fermentativas, anaeróbias ou aeróbias tolerantes, acidófilas, podendo ser classificadas de acordo o tipo de fermentação da hexose em homofermentativas e heterofermentativas (MCDONALD et al., 1991; SANTOS et al., 2013; NISHIDA et al., 2017).

A fermentação de carboidratos por bactérias lácticas heterofermentativas pode resultar na formação de ácido acético, álcool e CO₂ durante o período de processo fermentativo das silagens (LI et al., 2015).

O maior desenvolvimento de *Lactobacillus buchneri* na massa ensilada pode promover aumento da estabilidade aeróbia de silagens de milho (SCHMIDT e KUNG, 2010). Uma forma de potencializar o uso do inoculante é através da ativação prévia das bactérias, possibilitando o rápido desenvolvimento destas populações no início do processo fermentativo (SANTOS et al., 2008).

A inoculação de silagens tradicionalmente ocorre a partir da diluição em água de inoculante com cepas de bactérias lácticas liofilizadas. A ativação prévia do inoculante em leite desnatado reconstituído (LDR) antes do processo de ensilagem pode elevar a disponibilidade de bactérias ativas na massa ensilada, favorecendo-as à competição com outros microrganismos indesejáveis (SANTOS et al., 2008).

O conhecimento da diversidade microbiana epifítica pode contribuir para a compreensão do padrão fermentativo das silagens, assim como os fenômenos oriundos da exposição deste material à aerobiose. O uso de inoculantes liofilizados e/ou ativados no processo de ensilagem pode afetar a composição microbiana e redirecionar o padrão fermentativo e a estabilidade aeróbia das silagens.

Para se determinar alterações na comunidade microbiana, o uso técnicas de biologia molecular favorece o estudo aprofundado. Para a identificação de microrganismos isolados, a análise comparativa da sequência de determinados genes de macromoléculas conservadas, como rRNA, tem sido empregada. Sequências de bases nucleotídicas de *Lactobacillus* spp., como o DNA ribossomal (rDNA) 16S fornece base precisa para identificação e análise filogenética (KERMANS SHAHI e PEYMANFAR, 2012).

As sequências encontradas são comparadas com banco de dados como o National Center for Biotechnology Information (NCBI), alinhadas usando o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) para nucleotídeos.

Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito da inoculação com *Lactobacillus buchneri* liofilizado e ativado em LDR sobre as populações de bactérias lácticas de silagens de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Forragicultura do Centro de Ciências Agrárias (CCA), Campus II, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Ensilagem do Milho e Tratamentos

O híbrido utilizado neste experimento foi o Ag 1051. O milho foi cultivado na Fazenda Mata Limpa, localizada no Município de Areia, Estado da Paraíba, na microrregião do Brejo Paraibano, na latitude 6°58'07" S, e longitude 35°44'03" W e altitude de 627 m. Segundo a classificação de Köppen (quente e úmido), apresentando temperaturas médias anuais em torno de 24°C, umidade relativa do ar em torno de 80%, ocorrendo precipitação pluvial média de 1.400 mm anuais.

A colheita do milho foi realizada com idade cronológica de 97 dias, quando os grãos estavam no estágio leitoso/pastoso. As plantas foram colhidas inteiras de forma manual, picadas em máquina forrageira estacionária regulada para cortar a forragem em partículas de aproximadamente 2 cm e homogeneizada.

A forragem fresca foi transportada à Unidade de Forragicultura e foram ensiladas em silos tubulares de PVC, com 15 cm de diâmetro e 40 cm de altura, conforme os tratamentos: silagem não tratada (*in natura*); silagem com inoculante liofilizado (SIL); silagem com inoculante ativado (SIA).

O inoculante com cepas de *Lactobacillus buchneri* 1×10^5 ufc/g (*Lactobacillus buchneri* CNCM I - 4323, Lallemand Animal Nutrition's) foi aplicado de acordo com as recomendações do fabricante (1 g/ton de forragem). O inoculante liofilizado foi diluído em 100 ml de água destilada e aplicado uniformemente (2 ml/kg de forragem) a partir de um spray e mistura constante.

O inoculante foi pré-ativado em leite desnatado reconstituído (LDR) a 10%, 24 horas antes da ensilagem, conforme Santos et al. (2008). 10 g de leite em pó desnatado foram solubilizados em 100 ml de água destilada, adicionando-se 2 g de sacarose como fonte de energia para o crescimento microbiano. Esterilizou-se em autoclave a 120°C durante 15 minutos. Efetuou-se a inoculação conforme especificações do fabricante e crescimento da cultura em estufa a 25°C.

Após o crescimento, realizou-se a contagem de bactérias lácticas no LDR após 24 horas e no inoculante apenas dissolvido em água, através de meio de cultura MRS (De Man et al., 1960), para *Lactobacillus ssp.* Observaram-se populações de $2,1 \times 10^8$ e $4,5 \times 10^6$ ufc/mL no meio crescido em LDR e inoculante diluído em água, respectivamente. 10 ml de LDR com *Lactobacillus buchneri* pré-ativado foi diluído em 90 ml de água destilada. Aplicaram-se 2 ml/kg de forragem desta mistura com auxílio de spray pulverizador.

Misturaram-se homogeneamente os aditivos à forragem para o enchimento dos silos experimentais. Imediatamente, foi realizada a compactação da forragem nos silos, buscando-se atingir massa específica de 600 kg/m³ de matéria verde. Os silos foram armazenados durante 1, 3, 7, 14 e 70 dias a temperatura média de 24°C antes da abertura.

Estudos da Composição Microbiológica

Quantificação de populações de bactérias lácticas

A contagem de populações de bactérias lácticas foi realizada de acordo com as recomendações de González e Rodrigues (2003), coletando-se 25 g de amostra fresca de silagens extraídas conforme os períodos de abertura definidos.

Foram adicionados 225 mL solução de *ringer* estéril e processados em liquidificador por aproximadamente 1 minuto. Retirou-se 1 mL da mistura e se pipetou com a devida diluição (10^{-1} a 10^{-9}).

O plaqueamento foi realizado em duplicata para cada meio de cultura. As populações foram determinadas pela técnica seletiva de culturas em meio anaeróbico, onde se utilizou: o meio de cultura Ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) e incubou-se durante 48 horas em estufa à temperatura de 37° C.

As placas consideradas susceptíveis à contagem foram aquelas em que houve valores entre 30 e 300 UFC (unidade formadora de colônia) em uma placa de Petri. Consideraram-se então as médias das placas da diluição selecionada.

Técnica de Cultivo de Bactérias Lácticas

Após a quantificação das populações de bactérias lácticas por meio da técnica de *pour plate* em meio de cultura Ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe), 10 unidades formadoras de colônias (UFC), de cada tratamento, 70 dias após a ensilagem, foram selecionadas aleatoriamente, purificadas e cultivadas em tubo Falcon com 5 mL de caldo MRS durante 24h a 37°C.

Centrifugou-se as culturas por 10 minutos a 3600 rpm (rotação por minuto) para se obter o sedimento das células. Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de solução salina (solução Ringer) e homogeneizou-se em vórtex. Com auxílio de pipeta, transferiu-se todo o volume do sedimento para microtubo e centrifugou-se a 6000 rpm por 3 minutos.

Os microtubos foram armazenados em freezer a -18° C até os procedimentos de extração de DNA.

Extração de DNA

A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando-se o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). O sedimento foi ressuspenso em 480 µL de EDTA 50

mM (Ácido Etilico Diamino Tetracético) em vórtex. Adicionou-se 50 µL de Lisozima (concentração de 50 mg/mL) e incubou-se em banho-maria a 37°C durante 60 minutos. Centrifugou-se por 2 minutos a 12000 RPM e removeu-se o sobrenadante.

Para a lise celular, adicionou-se 600 µL de *Nuclei Lysis Solution* e incubou-se a 80°C. Adicionou-se 3 µL da solução de *RNAse* e homogeneizou-se, incubando posteriormente a 37°C por 60 minutos. Logo após, precipitou-se as proteínas com a adição de 200 µL de *Protein Precipitation Solution*. Centrifugou-se por 3 minutos a 12.000 RPM e transferiu-se o sobrenadante para um microtubo com 600 µL de Isopropanol absoluto a temperatura ambiente. Centrifugou-se por 2 minutos a 12.000 RPM e procedeu-se à lavagem do sedimento de DNA com 600 µL de Etanol 70%. Secou-se o sedimento de DNA a 37°C durante 20 minutos, adicionou-se 40 µL de DNA Rehydration Solution e incubou-se a 65°C durante 60 minutos.

Após a extração de DNA, seguiram-se os procedimentos de quantificação de DNA, realizados através de equipamento *Nanovue* (Nanodrop) no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Em média, as extrações resultaram numa concentração de 1.161,37 ng de DNA, com 1,9 grau de pureza. Após a quantificação, diluiu-se para a concentração de 20 ng de DNA por µL.

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A amplificação do fragmento 16S rDNA dos isolados ocorreu com o *Primer* 1492R- (TAG G(C/T)A CCT TGT TAC GAC TT) e *Primer* p027F (GAG AGT TGA TCC TGG CTC AG). (Heuer et al., 1997).

A reação PCR foi realizada em tubos de 0.2 mL contendo 50 µL da mistura de reação: DNA (80 ng); Tampão 5X (Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 8,0, KCl 0,5 mol/L); MgCl₂ 1,5 mmol/L, pH 8,0; dNTP mix 0,2 mmol/L (Promega); Taq polimerase 2U (Promega); primer p027F 0,12 µmol/L e 1429R 0,12 µmol/L (IDT Síntese Biotecnologia). O volume da mistura de reação foi completado para 50 µL com água ultrapura esterilizada.

A PCR foi realizada em termociclador ³Prime (Techne) e as condições de reações empregadas na realização da PCR foram: 94°C/5 minutos; 30 ciclos (desnaturação:

94°C/30 segundos; 60°C por 30 segundos); polimerização: 72°C/2 minutos; extensão final: 72°C/5 minutos.

Uma alíquota de 3 µL do produto de PCR foi misturado em 3 µL da mistura: 1 µL do GelRed (Biotium) e 2 µL do corante 6X Gel Loading (Promega), e analisada por eletroforese em gel de agarose (1,2 %) em tampão de Tris Borato-EDTA (TBE 1X).

O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e as imagens foram capturadas em sistema para fotodocumentação de geis (MBS).

O produto da PCR, um fragmento de aproximadamente 1500 pb, foi enviado à empresa Macrogen, Korea, para purificação e sequenciamento.

Análise das sequências dos isolados

As sequências dos isolados foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados do GenBank, e alinhadas usando o algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos.

As sequências do gene 16S rRNA que apresentaram similaridade igual ou maior que 95% foram consideradas como pertencentes a uma mesma Unidade Taxonômica Operacional (UTO) (ALTSCHUL et al., 1990).

Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

O ensaio foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamento e 5 repetições por tratamento, em cada período de abertura (1, 3, 7, 14 e 70 dias). As contagens microbianas foram transformadas em log₁₀. Os dados obtidos foram agrupados e discutidos através da análise estatística descritiva.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Populações de Bactérias Lácticas das Silagens

Os quantitativos de populações de bactérias ácido lácticas foram estimados nos diferentes períodos de abertura dos silos (1, 3, 7, 14 e 70 dias). As bactérias lácticas

apresentaram rápida velocidade de multiplicação, atingindo o ápice de desenvolvimento aos 7 dias de processo fermentativo (Figura 1).

As silagens inoculadas com *Lactobacillus buchneri* pré-ativado tiveram os maiores valores de populações de bactérias lácticas até o 14º dia do período fermentativo, atingindo 11,0 log ufc/g forragem no período de 7 dias de fermentação. Resultado esperado, uma vez que houve a adição de maior número de bactérias ativas, facilitando assim a sua multiplicação. Após o sétimo dia de fermentação, o número de bactérias lácticas reduziu em todas as silagens. Isso pode ser justificado pela dinâmica de crescimento das populações de bactérias lácticas, que tende a estabilizar-se e reduzir o número de microrganismos após a acidificação da massa ensilada.

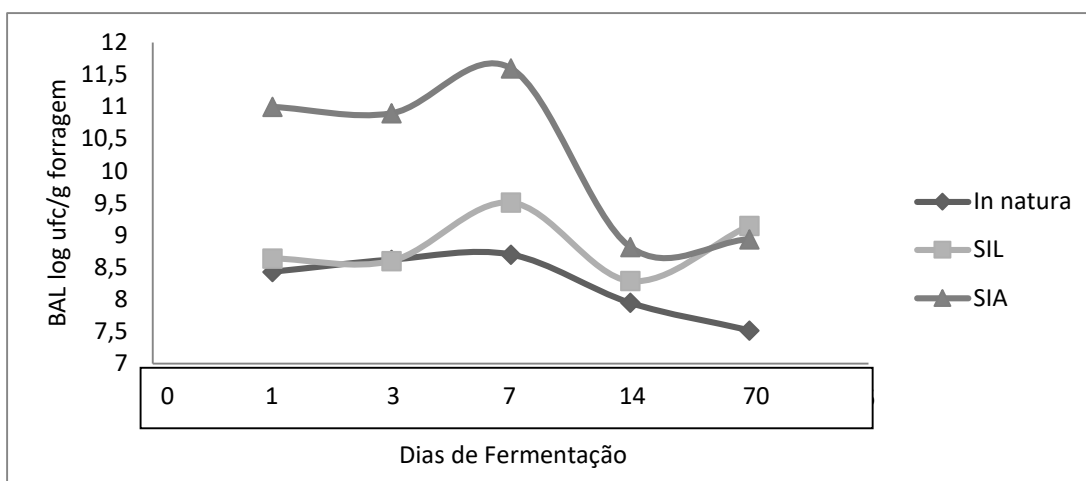


Figura 1. Valores médios de crescimento de bactérias ácido lácticas em silagens de milho *in natura* e inoculadas com *Lactobacillus buchneri* durante diferentes períodos de fermentação.

SIL = Silagem tratada com inoculante liofilizado; SIA = Silagem tratada com inoculante ativo

Embora tenha apresentado menor crescimento, quando comparada com a inoculação ativa, as populações de bactérias lácticas das silagens tratadas com inoculante liofilizado estabilizaram aos 70 dias com populações acima de 9,0 log ufc/g forragem.

O processo fermentativo da silagem é complexo e envolve muitas espécies de bactérias ácido lácticas e suas interações. O uso de inoculantes específicos é indicado para dominar ou superar o número de bactérias lácticas epifíticas presentes na forragem, seja para melhoria do processo fermentativo (OLIVEIRA et al., 2017) ou para aumento da estabilidade aeróbia das silagens (WEISS et al., 2016). Embora o acréscimo de bactérias lácticas na massa ensilada promova a maior disponibilidade de microrganismos

específicos, o maior ou menor grau de desenvolvimento destas bactérias dependerá das condições do meio (GIRAFFA et al., 2010). Estima-se que os inoculantes forneçam 10^6 ufc/g de forragem (MCDONALD et al., 1991).

Observou-se neste estudo, que a maioria dos isolados (93,34%) era formada por cepas produtoras de ácido láctico, da espécie *Lactobacillus plantarum* (Tabela 1). *Lactobacillus plantarum* são bactérias frequentemente encontradas em silagens. Consideradas heterofermentativas facultativas (SANTOS et al., 2013), são capazes de produzir D-L- ácido láctico (racêmico).

Tabela 1. Identificação molecular de amostras de bactérias do gênero *Lactobacillus* isoladas

Amostra	Espécie	Percentual de Identificação (%)	Acesso Gen Bank
Silagem sem aditivo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	NR 042394.1
Silagem sem aditivo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	NR 042394.1
Silagem sem aditivo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	NR 042394.1
Silagem sem aditivo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97	NR 042394.1
Silagem sem aditivo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	94	NR 117813.1
Silagem sem aditivo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	NR 117813.1
Silagem sem aditivo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	NR 117813.1
Silagem sem aditivo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	NR 117813.1
Silagem sem aditivo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	NR 117813.1
Silagem sem aditivo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	NR 117813.1
Silagem Inoculante liofilizado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	NR 104573.1
Silagem Inoculante liofilizado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	NR 117813.1
Silagem Inoculante liofilizado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	NR 117813.1
Silagem Inoculante liofilizado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	NR 117813.1
Silagem Inoculante liofilizado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97	NR 117813.1
Silagem Inoculante liofilizado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97	NR 117813.1
Silagem Inoculante liofilizado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	94	NR 117813.1
Silagem Inoculante liofilizado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	NR 042394.1
Silagem Inoculante liofilizado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	NR 117813.1
Silagem Inoculante liofilizado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	NR 117813.1
Silagem Inoculante Pré-ativado	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	95	NR 025447.1
Silagem Inoculante Pré-ativado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	NR 117813.1
Silagem Inoculante Pré-ativado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97	NR 117813.1
Silagem Inoculante Pré-ativado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	NR 117813.1
Silagem Inoculante Pré-ativado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	NR 117813.1
Silagem Inoculante Pré-ativado	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	97	NR 025447.1
Silagem Inoculante Pré-ativado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95	NR 104573.1
Silagem Inoculante Pré-ativado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	NR 117813.1
Silagem Inoculante Pré-ativado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95	NR 042394.1
Silagem Inoculante Pré-ativado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96	NR 117813.1

A elevada frequência de *L. plantarum* nas silagens de milho promove efetiva fermentação do ácido láctico, reduzindo rapidamente o pH do massa ensilada e impedindo

o desenvolvimento de microrganismos deletérios à silagem, como clostrídios e enterobactérias. Além da diminuição do pH a partir da produção de ácido láctico, *L. plantarum* também inibe o crescimento de fungos filamentosos através da produção de atividade antifúngica (ARASU et al., 2013).

Foram identificadas neste estudo, cepas de *Lactobacillus paraplantarum* (6,6% dos isolados) nos isolados de silagens de milho inoculadas com bactérias pré-ativadas em LDR. Zhang et al. (2017) observaram a presença e predominância de *L. paraplantarum* nas populações de bactérias ácido lácticas em silagens de milho com alta umidade.

Lactobacillus paraplantarum é uma espécie de bactéria láctica heterofermentativa facultativa com semelhanças fenotípicas à bactéria *L. plantarum*. Cresce lentamente a 15°C e rapidamente na faixa de temperatura de 30 a 37°C, não sendo detectado crescimento a 45°C. Desenvolvem-se bem na faixa de pH 5,0 a 7,0, possuindo crescimento deficiente a partir de pH 4,0 (CURK et al, 1996).

Wang et al. (2017), ao caracterizar isolados de bactérias lácticas e seus efeitos na fermentação de silagens, verificaram crescimento de *L. paraplantarum* limitado até temperatura de 10°C e pH 3,0. De acordo com os autores, o crescimento de cepas de *L. paraplantarum* em ambientes de baixo pH e temperatura comprovam a natureza resistente e tolerante a acidez desta espécie.

As cepas de *L. plantarum* produzem bacteriocina classe II. A bacteriocina é um tipo de peptídeo ribossomal antimicrobiano sintetizado por bactérias, capaz de matar ou inibir outras estirpes bacterianas. As bacteriocinas de classe II consistem em duas moléculas peptídicas diferentes que requerem quantidades iguais de cada peptídeo para exercer atividade microbiana. *L. paraplantarum* pode inibir o crescimento de espécies de bactérias indesejáveis, como Enterobactérias (LIU e LI, 2016).

O sequenciamento do fragmento 16S rDNA produzido pela reação da cadeia da polimerase usando os Primers 1492R e p027F revelou que os isolados estavam intimamente relacionados com o *Lactobacillus plantarum*. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (Figura 2).

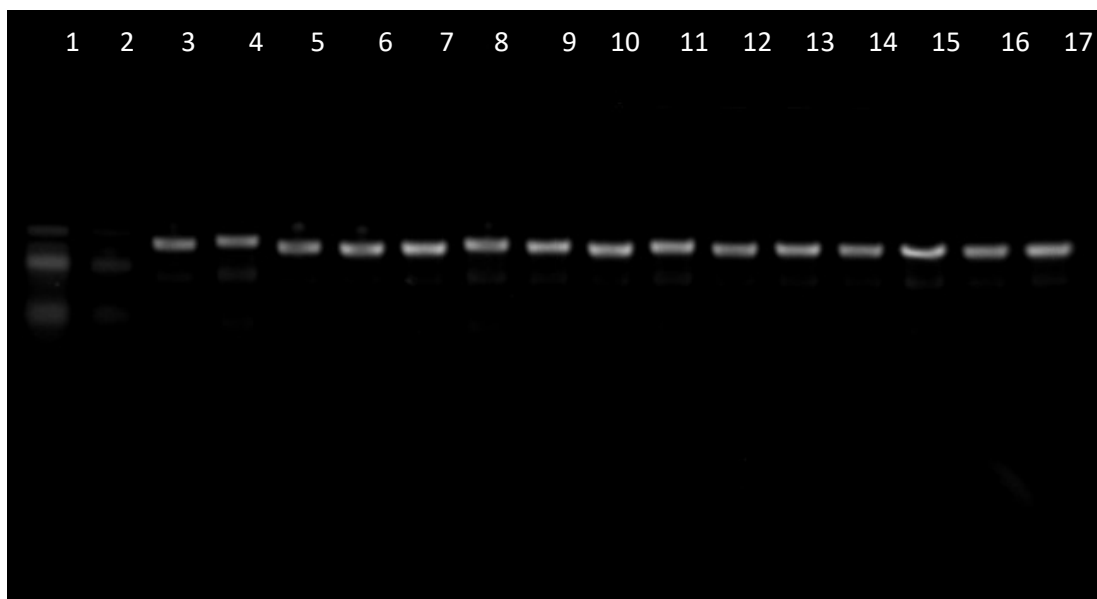


Figura 2. Produtos de amplificação de PCR para lactobacilos. Linha1. Marcador molecular (100bp DNA Ladder); Linha 2. Branco; Linhas 3 a 17 – *Lactobacillus plantarum*.

Não foram identificadas bactérias da espécie *Lactobacillus buchneri* nos isolados selecionados a partir das silagens de milho inoculadas. Possivelmente, devido à maior expressividade nas silagens de milho, *L. plantarum* dominou a fermentação no período fermentativo.

Bactérias heterofermentativas obrigatórias, como *Lactobacillus buchneri* apresentam atividade sobre o perfil fermentativo e estabilidade aeróbia das silagens, entretanto, possui crescimento lento, sendo verificados seus efeitos a partir de 45 a 60 dias (OUDE ELFERINK et al., 2001; SCHMIDT et al., 2009).

O lento desenvolvimento deste microrganismo se deve ao metabolismo de conversão de ácido láctico a ácido acético em meio de pH ácido. Como as bactérias lácticas homofermentativas multiplicam-se de forma acelerada, diminuindo o pH da massa ensilada rapidamente devido à maior produção de ácido láctico, as bactérias *L. buchneri* limitam o crescimento e ativam o metabolismo de degradação de ácido láctico, como estratégia de manutenção da viabilidade celular (OUDE ELFERINK et al., 2001).

5. CONCLUSÕES

A aplicação de inoculante liofilizado e ativado na massa ensilada promoveu aumento considerável das populações de bactérias ácido lácticas nas silagens de milho, durante todo o período fermentativo, quando comparadas com as silagens sem aditivo.

Não houve identificação de bactérias lácticas da espécie *Lactobacillus buchneri* dentre os isolados capturados nas silagens de milho, mesmo aquelas tratadas com inoculante liofilizado e pré-ativados em leite desnatado reconstituído.

6. REFERÊNCIAS

ARASU, M.V.; JUNG, M.W.; ILAVENIL, S.; JANE, M.; KIM, D.H.; LEE, K.D.; PARK, H.S.; HUH, T.Y.; CHOI, G.J.; LIM, Y.C.; AL-DHABI, N.A.; CHOI, K.C. Isolation and characterization of antigungal compound from *Lactobacillus plantarum* KCC-10 from forage silage with potential beneficial properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 1172-1185. 2013.

<http://doi.org/10.1111/jam.12319>

CURK, M.C.; HUBERT, J.C.; BRINGEL, F. *Lactobacillus plantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 595-598. 1996.

<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/46/2/ijsem-46-2-595.pdf?expires=1520078757&id=id&accname=guest&checksum=CBA028AC487D2C9FEE60CDDFE8D84316>

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n. 1, p. 562-567, 2003.

<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.1.562-567.2003>

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 480-487. 2010.

<http://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.001>

GONZÁLEZ, G.; RODRÍGUEZ, A.A. Effect of storage method on fermentation characteristics, aerobic stability and forage intake of tropical grasses ensiled in round bales. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.3, p.926-933, 2003.

[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73675-3](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73675-3)

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

<http://doi.org/10.3168/jds.2008-1788>

KERMANS SHAHI, R.K.; PEYMANFAR, S. Isolation and identification of Lactobacilli from cheese, yoghurt and silage by 16S rDNA gene and study of bacteriocin and biosurfactant production. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 5, n. 4, p.528-532. 2012.

<http://doi.org/10.5812/jjm.3444>

LI, D.; NIA, K.; PANG, H.; WANG, Y.; CAIL, Y.; JIN, Q. Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage. **Asian Australasian Journal Animal Science**, v. 28, n. 5, p. 620-631. 2015.

<http://dx.doi.org/10.5713/ajas.14.0439>

LIN, C.; BOLSEN, K.K.; BRENT, B.E.; FUNG, D.Y.C. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. **Journal Applied Microbiology**, v. 73, p. 375-387. 1992.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04992.x>

LIU, L.; LI, P. Complete genome sequence of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9, a probiótico starter producing class II bacteriocins. **Journal of Biotechnology**, v. 222, p. 15-16. 2016.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.003>

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

NISHIDA, S.; ISHII, M.; NISHIYAMA, Y. ABE, S.; ONO, Y.; SEKIMIZU, K.

Lactobacillus paraplantarum 11-1 isolated from rice bran pickles activated innate immunity and improved survival in a silkworm bacterial infection model. **Microbiology**, v. 8, n. 436, p. 1-8. 2017

<http://sci-hub.la/https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00436>

OLIVEIRA, A.S.; WEINBERG, A.G.; CERVANTES, A.A.P.; ARRIOLA, K.G.; JIANG, Y.; KIM, D.; LI, X.; GONÇALVES, M.C.M.; VYAS, D.; ADESOGAN, A.T. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability and the performance of dairy cows. *Journal Dairy Science*, v. 100, p.1-17. 2017.

<http://doi.org/10.3168/jds.2016-11815>

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

<http://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>

PAHLOW, G.R.E.; MUCK, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H. SPOESLTRA, S.F. Microbiology of ensiling. **Silage Science and Tecnology**. D.R Buxton, R., 2003.

SANTOS, E.M.; SILVA, T.C.; MACEDO, C.H.O.; CAMPOS, F.S. Lactic acid bacteria in tropical Grass silages. In. *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purpose*, p. 335-362. **Intech**. 2013.

<http://dx.doi.org/10.5772/50703>

SANTOS, E.M.; ZANINE, A.M.; FERREIRA, D.J.; OLIVEIRA, J.S.; PENTEADO, D.C.S.; PEREIRA, O.G. Inoculante ativado melhora a silagem de capim-tanzânia (*Panicum maximum*). **Archive Zootecnia**, v. 57, n. 217, p. 35-42. 2008.

<http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web>

SCHMIDT, R. J.; KUNG JR., L. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a

homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.4, 2010.

<http://doi.org/10.3168/jds.2009-2555>

SCHMIDT, R.J.; HU, W.; MILLS, J.A.; KUNG JR., L. The development of lactic acid bacteria and *lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation on alfalfa silage. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 5005-5010, 2009.

<http://doi.org/10.3168/jds.2008-1701>

WANG, S.; YUAN, X.; DONG, Z.; LI, J.; GUO, G.; BAI, Y.; ZHANG, J.; SHAO, T. Characteristics of isolated lactic acid bacteria and their effects on the silage quality. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v. 30, n. 6, p. 819-827. 2017.

<https://doi.org/10.5713/ajas.16.0589>

WEISS, K.; KROSCHEWSKI, B.; AUERBACH, H. Effects of air exposure, temperature and additives on fermentation characteristics, yeast count, aerobic stability and volatile organic compounds in corn silage, v. 99, p.8053-8069. 2016.

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10323>

ZHANG, M.; WANG, Y.; TAN, Z.; LI, Z.; LI, Y.; LV, H.; ZHANG, B.; JIN, O. Microorganism profile, fermentation quality and rumen digestibility in vitro of maize-stalk silages produced at different maturity stages. **Crop & Pasture Science**. 2017.

<http://dx.doi.org/10.1071/CP16324>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A planta de milho é uma forrageira com elevado índice de ensilabilidade devido as suas características fermentativas, como adequado teor de matéria seca na fase de corte, concentração de carboidratos solúveis suficientes para a produção de ácido láctico e consequente acidificação da massa ensilada, baixa capacidade tamponante e quantitativo de populações de bactérias lácticas adequado. Entretanto, o alto conteúdo de carboidratos residuais no produto final predispõe a silagem de milho à baixa estabilidade aeróbia, o que pode acentuar as perdas após a abertura dos silos.

O uso de aditivos como a ureia e inoculantes à base de cepas heterofermentativas constitui tentativa de dirimir as perdas fermentativas, elevar o valor nutritivo e a estabilidade aeróbia das silagens de milho.

A aplicação de ureia na ensilagem de milho promoveu melhorias no padrão fermentativo e composição bromatológica (com aumento do teor proteico e redução da fração fibrosa) das silagens de milho, indicando-se a aplicação de 1,0 a 1,5% de ureia (com base na matéria seca). Além disso, o uso de ureia elevou a estabilidade aeróbia das silagens de milho.

A inoculação da forragem de milho com cepas de *Lactobacillus buchneri* liofilizadas ou pré-ativadas em leite desnatado reconstituído (LDR) isoladamente não apresentaram alterações expressivas na estimativa de perdas fermentativas, composição bromatológica, afetando o padrão fermentativo e a estabilidade aeróbia das silagens. Entretanto, quando se inocularam as cepas de bactérias heterofermentativas liofilizadas ou pré-ativadas em conjunto com 1% de ureia, obtiveram-se resultados benéficos à composição bromatológica, redução de perdas fermentativas, melhorias do processo fermentativo e aumento da estabilidade aeróbia das silagens de milho.

A identificação de bactérias lácticas isoladas não indicou a predominância de *Lactobacillus buchneri* nas silagens de milho após 70 dias de processo fermentativo.