

Desenvolvimento de Aditivos Microbianos para Ensilagem: Realidade e Perspectivas

José Leonardo Ribeiro¹, Oscar César Müller Queiroz¹,
Luiz Gustavo Nussio²

¹ Aluno de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens – USP/ESALQ, Piracicaba, SP.

² Professor Associado, Departamento de Zootecnia- USP/ESALQ, Piracicaba, SP.

1 - Introdução

A colheita de forragem feita pelo animal constitui a forma mais barata de alimentação de animais ruminantes, no entanto, a estacionalidade de produção, constitui um dos fatores mais restritivos da produção de bovinos em pastagens no Brasil. Para atenuar os efeitos desta distribuição irregular de forragem, que determina desempenho animal insatisfatório durante o inverno, uma das alternativas seria o manejo racional das pastagens, associado à conservação da forragem excedente, na forma de silagem, para ser utilizada durante o período de escassez.

Apesar de alguns produtores rurais dominarem a técnica de ensilagem, ainda existe carência muito acentuada de informações precisas sobre este processo, tanto por parte dos usuários desta tecnologia quanto pelos técnicos que a divulgam. Erroneamente, muitos tentam corrigir ineficiências cometidas durante as etapas da ensilagem adicionando aditivos, os quais em situações inadequadas não proporcionam benefícios para a silagem, além de elevar os custos da forragem produzida.

Como consequência, muitos pecuaristas se frustram com conservação de forragem, quando de fato, esta situação poderia ser conciliada, caso os avanços tecnológicos, hoje amplamente divulgados, fossem empregados oportunamente.

De acordo com Muck & Kung (1997), são várias as decisões a serem tomadas pelos produtores, a respeito do uso de aditivos. Estes produtores devem estar prontos para responder a algumas perguntas: Por que devo usar um aditivo para silagem?; qual o melhor tipo de aditivo de acordo com a cultura a ser ensilada?; de qual fabricante deveria comprar?; e qual a real expectativa deve ser criada a respeito do aditivo, quanto aos parâmetros técnicos?

Dentro deste contexto, o conhecimento dos microrganismos utilizados e seu modo de ação, bem como as consequências de seu uso ao longo de todo o processo de conservação e, subsequente desempenho e produto animal, é fundamental para a decisão final. A dificuldade em se tomar a decisão acertada está exatamente em se considerar todas as etapas nos quais o aditivo exerça efeito direto e indireto.

2 - Microbiologia da silagem

O papel das bactérias produtoras de ácidos, no processo de ensilagem, foi identificado desde o início do século passado, mais precisamente em 1916, por meio da publicação de Sherman, intitulada de "contribuição para a bacteriologia de silagem" (Woolford, 1984).

Estudos realizados com silagem de milho concluíram que: a) as bactérias são as principais responsáveis pela produção de ácidos e perdas de açúcar na silagem, b) o álcool é produzido no estágio inicial da ensilagem, como resultado da atividade das enzimas da planta e, posteriormente, fermentação de leveduras, c) a proteólise é iniciada pelas enzimas da planta e, subsequentemente, pela atividade microbiana, d) o dióxido de carbono é liberado inicialmente pelas mudanças enzimáticas e respiratórias, mas as leveduras são responsáveis por esta produção após o primeiro ou segundo dia da ensilagem (Lamb, 1917 citado por Woolford, 1984).

Os estudos indicaram que alterações observadas no início da fermentação são decorrentes de características inerentes a própria planta forrageira e, nos estádios seguintes, pela atividade microbiana. Apesar deste padrão de eventos ainda ser aceito como um acontecimento em silagem, o conceito sobre o papel dos microrganismos tem sido, contudo, modificado, uma vez que as bactérias, e não leveduras, representam os principais microrganismos envolvidos na fermentação de plantas forrageiras tradicionais.

No processo fermentativo, Woolford (1984) ressalta as bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias formadoras de endósporo (gênero *Clostridium* e *Bacillus*), os coliformes e os fungos (leveduras e fungos filamentosos) como sendo os quatro grupos mais significativos de microrganismos em silagens. Ocasionalmente, bactérias produtoras de ácido propiônico e listéria são encontradas.

Dentre estes microrganismos, as BAL são as responsáveis pelos melhores resultados durante a fermentação. A primeira tentativa para classificar este grupo de bactérias ocorreu em 1919, em que as mesmas eram unificadas em função de suas propriedades. Foram descritos quatro gêneros de BAL associadas ao processo fermentativo: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. A Tabela 1 traz as principais espécies de bactérias lácticas encontradas nas silagens.

Tabela 1 - Espécies de bactérias ácido lácticas encontradas em silagem.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>
Homofermentativa	Heterofermentativa	Homofermentativa	Heterofermentativa
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>L. citrovorum</i>
<i>L. casei</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>S. faecium</i>	<i>L. dextranicum</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>S. lactis</i>	<i>L. mesenteroides</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>L. viridescens</i>		<i>P. pentosaceus</i>

Fonte: Adaptado de Woolford (1984).

3 - Evolução dos aditivos para silagem

O primeiro uso conhecido de culturas de BAL foi na ensilagem de polpa de beterraba na França, no início do século passado. O sistema de inoculação foi desenvolvido na Alemanha, o qual incluiu o crescimento de bactérias na propriedade. No entanto, muitas das tentativas iniciais para o uso de inoculantes em silagem não tiveram sucesso. As BAL não eram adaptadas àquele meio ou às culturas de bactérias não eram, na ocasião, viáveis para uso (Spoelstra, 1991 citado por Wilkinson et al., 2003). Também foram apontados alguns resultados indesejados com alguns inoculantes, particularmente em culturas com menor quantidade de substrato fermentativo.

Entretanto, o desenvolvimento de tecnologia, nas décadas de 70 e 80, conduziu a melhorias na produção comercial de culturas de bactérias usadas em inoculantes.

Talvez nenhuma outra área da produção de silagem recebeu tanta atenção entre fazendeiros e pesquisadores, nos anos oitenta e noventa, como os inoculantes bacterianos. Pesquisas foram conduzidas para um melhor conhecimento de microbiologia da silagem (McDonald et al., 1991). Os inoculantes tornaram-se os mais comuns aditivos de silagens, particularmente nas regiões onde grãos de cereais, leguminosas e gramíneas emurchecidas eram as principais culturas colhidas para ensilagem (Bolsen et al., 1995).

4 - Inoculantes microbianos

Na forragem destinada a confecção de silagem, a presença de bactérias desejáveis e indesejáveis é algo esperado. Neste contexto, a adição de um inoculante microbiano tem a finalidade de proporcionar o rápido crescimento de BAL homofermentativas, as quais poderão dominar a fermentação e, como consequência, propiciar silagem de alta qualidade (Kung, 2001). Entretanto, para que estes microrganismos atuem favorecendo o decréscimo do pH, vários fatores deverão ser atendidos.

Condições anaeróbias e a obtenção de altos teores de matéria seca (MS), premissas básicas desejáveis, podem ser difíceis de serem obtidas (Woolford, 1984).

4.1 - Adequação do uso de inoculantes

McDonald et al. (1991) classificam os aditivos para silagem em cinco categorias: fontes de nutrientes e/ou MS, incluindo minerais e nitrogênio não protéico; inibidores de fermentação; inibidores da deterioração aeróbia; estimulantes da fermentação, como inoculantes bacterianos e enzimas; e materiais absorventes incluindo alguns subprodutos da colheita e palhadas.

Dentre os estimulantes da fermentação, os inoculantes microbianos vêm recebendo grande destaque. Segundo Muck & Kung (1997), atualmente estes inoculantes abrangem a classe de aditivos com mais rápido desenvolvimento em todo o mundo.

A maioria dos inoculantes microbianos são constituídos exclusivamente de BAL homofermentativas ou heterofermentativas facultativas, por serem os microrganismos mais eficientes em sintetizar ácido láctico. Estes produtos para silagem têm sido usados

com a possibilidade de melhorar a fermentação e evitar a produção de ácido butírico em silagens úmidas (teores de MS inferiores a 25%) (Bolsen et al., 1995), embora, o melhor desempenho de BAL se dê em silagens com teor de MS superior a 30%.

O uso de inoculantes para melhorar a fermentação da silagem faz parte de uma longa história. Atualmente, muitas variedades e formulações de bactérias são vendidas comercialmente para este propósito. Kung et al. (2003) descrevem as bactérias mais comuns encontradas nestes produtos comerciais (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição das bactérias mais comuns e seu uso para alterar a fermentação da silagem.

Organismos	Razões para adição	Aspectos (+) e (-) do uso
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>acidophilus</i> , <i>brevis</i> , <i>Produção rápida e predomina o ácido láctico</i>		(+) aproveitamento de energia e recuperação de MS; redução da proteólise.
<i>Bulgarcicus</i> , <i>cremoris</i> , <i>curvatus</i> , <i>splosus</i> , <i>lático salivarius</i>		(-) baixos níveis de ácido acético podendo resultar em menor estabilidade aeróbica; algumas espécies sintetizam pouco ácido láctico até que o pH caia abaixo de 5
<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>cerevisiae</i> , <i>Produção rápida e predomina o ácido láctico</i>		(+) cresce rapidamente em pH alto (5-6,0) podendo dominar o início da fermentação
<i>Pentosaceus</i>		(-) baixos níveis de ácido acético podem reduzir a estabilidade aeróbica.
<i>Enterococcus faecium</i>	Rápido crescimento e predomina o ácido láctico	Rápido crescimento e predomina o pH elevado (5-5,5) e quando há presença de oxigênio.
	ácido láctico	(-) baixos níveis de ácido acético podem comprometer a estabilidade; algumas espécies podem ser proteolíticas.
<i>Lactobacillus lactis subspécie cremoris</i> , <i>Produção rápida e predomina o ácido láctico</i>		(+) cresce rapidamente em pH elevado (5-6,5)
<i>Gluciferobacterium</i>		(-) baixos níveis de ácido acético (menor estabilidade)
<i>Gluciferobacterium</i>		(+) ácidos acético e propiônico têm ação fungicida em pH baixo.
<i>Shermanii</i>	fonte de energia para síntese de ácido acético e propiônico	(-) crescimento lento, relativamente intolerante a acidez, obrigatoriamente anaeróbico
<i>Lactobacillus buchneri</i>	Pode metabolizar anaerobicamente ácido acético e propiônico, os quais têm ação fungicida em ácido.	(+) sintetizam ácido acético e propiônico, os quais têm ação fungicida, em pH baixo
	estar associada com fermentações ricas em ácido propiônico	(-) Menores perdas de MS durante ensilagem

Fonte: Adaptado de Kung et al. (2003)

No passado, a atuação de BAL era classificada de acordo com dois tipos de fermentação. Aquela que produzia apenas ácido láctico pela fermentação de glicose (homolática) e, aquela que produzia vários produtos finais (heterolática). Kung et al. (2003) ressaltam que a primeira situação é teoricamente mais desejável, pois a conversão de uma molécula de glicose em duas de ácido láctico e dois moles de ATP propicia alta recuperação de energia e MS (Tabela 3), o que resulta em maior consumo de silagem, sendo esta rica em energia quando comparada com outros tipos de fermentação.

Tabela 3 - Fermentação predominante em silagens e recuperação teórica de matéria seca (MS) e energia.

Tipo de fermentação	Produto final	Recuperação (%)	
		MS	Energia
Homolática (glicose)	ácido láctico	100	99
Heterolática (glicose)	ácido láctico, etanol, CO ₂	76	98
Heterolática (frutose)	ác. láctico, acético, manitol, CO ₂	95	99
Levedura (glicose)	etanol, CO ₂	51	99
<i>Clostridium</i> (glicose e lactato)	ácido butírico, CO ₂	49	82

Fonte: Kung et al. (2003)

Dentro deste contexto, os inoculantes atuais contêm vários grupos de bactérias homoláticas, em decorrência do potencial sinérgico de ação destes grupos. Lindgren et al (1985) citados por Kung et al. (2003) reportaram que uma mistura de *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* foi mais efetivo que um inoculante contendo apenas *Enterococcus* ou ácido fórmico. Apesar de *Enterococcus* apresentar maior crescimento em pH mais alto (> 5,0) e na presença de oxigênio, com o decorrer da fermentação esta espécie decresce bruscamente (intolerante à acidez) e, o ambiente passa então a ser dominado por outros microorganismos, tais como *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*.

Os *Pediococcus* são comumente adicionados em muitos inoculantes por serem mais tolerantes a altos teores de MS, temperatura e condições de pH, permitindo que esta colônia de microorganismo domine os estádios iniciais de fermentação, quando o crescimento de *Lactobacillus* é tímido. Tanaka & Ohmomo (2000) verificaram que espécies de *Lactobacillus* dominaram a fermentação em silagem de capim do gênero *Panicum maximum* com alto teor de umidade (16,8% MS), ao passo que uma colônia de *Pediococcus* dominou a fermentação quando o teor de MS foi de 63,5%, provavelmente devido a maior tolerância a baixa atividade de água.

Embora alguns autores tenham verificado, em dados sumarizados de vários experimentos, melhorias não apenas no processo fermentativo, como também no desempenho de animais alimentados com silagens inoculadas com BAL (Kung & Muck, 1997), estes resultados devem ser analisados com certa cautela (Kung et al., 2003). Isto se deve ao fato dos inoculantes nem sempre serem iguais e as condições (taxa de aplicação, viabilidade do inoculante, espécie de bactéria, material a ser ensilado, teor de umidade) da avaliação variam significativamente entre os estudos.

Kung et al. (2003) ainda ressaltam que numerosos estudos sem resultados positivos tendem a não ser publicados. Além disso, produtos contendo organismos com o mesmo nome não são necessariamente iguais. Para avaliar a eficiência de inoculantes contendo *Lactobacillus plantarum* (MTD1), Owen & Moran (1993) citados por Muck & Kung (1997) sumarizaram 14 estudos com vacas em lactação e 19 com bovinos de corte,

6 consumindo silagens de gramíneas, milho e alfafa. Os experimentos foram conduzidos em universidades e institutos de pesquisa, na América do Norte e Europa, os quais usaram MTD1, como mostram as Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Efeito do fornecimento de silagem inoculada com *Lactobacillus plantarum* (MTD1) sobre a ingestão de matéria seca (MS) e produção de leite.

	Tratamentos		Diferença
	Controle	<i>L. plantarum</i>	
Ingestão MS (kg.d ⁻¹)	10,48	10,98	+4,8%
Produção de leite (kg.d ⁻¹)	25,94	27,12	+4,6%

Fonte: Adaptada de Muck & Kung (1997).

Tabela 5 - Efeito do fornecimento de silagem inoculada com *Lactobacillus plantarum* MTD1 sobre a ingestão de MS e ganho de peso em gado de corte.

	Tratamentos		Diferença	P	
	Controle	<i>L. plantarum</i>			
Ingestão MS (kg.d ⁻¹)	4,50	Animais em Crescimento			
		Silagem de Gramíneas (n=5)	4,74	+5,3%	NS
		Silagem de Alfafa (n=5)	0,657	+15,2%	<0,01
Ganho de Peso (kg.d ⁻¹)	0,966	Animais em Terminação			
		Silagem de Gramíneas (n=9)	8,15	+12%	<0,10
		Silagem de Alfafa (n=5)	1,150	+9,4%	<0,01
Ingestão MS (kg.d ⁻¹)	6,58	Animais em Crescimento			
		Silagem de Gramíneas (n=5)	6,82	+3,8%	NS
		Silagem de Alfafa (n=5)	0,508	+9,8%	<0,01

Fonte: Adaptada de Muck & Kung (1997).

As análises estatísticas revelaram que apesar da ingestão de MS não ter sido afetada pela inoculação, vacas leiteiras alimentadas com silagem inoculada produziram 4,6% a mais de leite. Para todos os estudos envolvendo o gado de corte, animais alimentados com silagem inoculada consumiram 7,5% a mais e ganharam 11,1% mais peso (Tabela 5).

5 - Adequação do inoculante à fonte de forragem

5.1 - Silagem de gramíneas tropicais

A utilização de gramíneas tropicais perenes, para confecção de silagem, vem sendo difundida entre produtores e técnicos como opção técnica economicamente interessante para uso comercial. Após seu estabelecimento, os tratos culturais são facilitados e, uma vez atendidas suas exigências, por meio da calagem e adubação de reposição, podem proporcionar produtividade adequada para a confecção de silagens de qualidade (Coelho et al., 2003). Contudo, para que uma boa silagem de gramínea seja confeccionada, a adição de aditivos, bem como qual aditivo utilizar, se caracterizam como ações indispensáveis.

De acordo com Kung (2001), a inoculação com BAL homofermentativas tem respondido de forma mais efetiva quando adicionadas em culturas perenes, tais como capins e alfafa. As melhores respostas obtidas, provavelmente, são explicadas pelo substrato fermentescível destas culturas. Estas BAL são capazes de utilizar frutossanas como fonte de carboidratos.

O grande interesse em utilizar estas bactérias se baseia no fato de frutossanas serem a maior fonte de carboidratos em gramíneas, além de ser insuficientemente fermentada por populações epifitas de *Lactobacillus*. Deste modo, seleção e inoculação de BAL com altos níveis de frutana hidrolase, em gramíneas forrageiras de clima temperado, tem resultado em fermentações satisfatórias (Winters et al., 1998).

Adicionalmente, silagens confeccionadas com gramíneas, em regiões tropicais e subtropicais, são frequentemente caracterizadas pela alta concentração de ácido acético. Além de ser um ácido mais fraco que o láctico, este exerce um efeito tampão contra o declínio do pH, quando estes valores encontram-se abaixo de 4,8 (Bales et al., 1989 citado Soltenberger et al., 2003). Estes fatores estimularam as pesquisas em adicionar culturas comerciais de BAL em silagem.

Em decorrência dos inúmeros questionamentos sobre a eficiência dos inoculantes para silagem, Muck & Kung (1997) sumarizaram dados de valor nutritivo, parâmetros físicos e desempenho de animais, entre 1990 a 1995 e, reportaram que a inoculação com BAL reduziu o pH das silagens em 60% dos casos (n=221), a razão ácido láctico:acético foi maior em 60% dos estudos (n=233), a queda na síntese de N-NH₃ foi de aproximadamente 62% (n=148) e houve incremento do coeficiente de digestibilidade da MS em 23% dos experimentos (n=82). Quanto ao valor alimentício destas silagens, foram encontradas respostas positivas referentes ao consumo de MS (28% de um total de 67 avaliações), em ganho de peso (53% de um total de 15 experimentos) e produção de leite (47% de uma total de 36 estudos).

Roth et al. (2005) avaliaram a composição química e os efeitos dos inoculantes bacterianos na ensilagem da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. O capim foi colhido quando apresentava 50 dias de crescimento e tratado com *Lactobacillus buchneri* e *Propionibacterium acidipropionici* + *Lactobacillus plantarum*. Não foram verificadas

diferenças entre as silagens tratadas e a controle, em relação aos teores de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), hemicelulose, celulose e lignina. No entanto, ocorreu menor perda de proteína bruta (PB) nas silagens tratadas em relação ao controle, provavelmente, devido ao melhor controle da ação de microrganismos indesejáveis, reduzindo a produção de amônia (NH₃).

Após analisarem alguns experimentos conduzidos com gramíneas tropicais, Sollenberger et al. (2003) ressaltaram que a maioria das respostas positivas e consistentes, para inoculação com bactérias ácido lácticas, têm sido alcançadas quando as forragens são ensiladas com altos teores de carboidratos solúveis. Isto sugere que a principal limitação de se conservar gramíneas tropicais não é decorrente da sua população epífita de BAL, mas sim dos baixos teores de carboidratos solúveis, os quais limitam a atuação bem sucedida destas bactérias. Esta situação é presenciada em países de clima tropical, quando as forragens são ensiladas com maior idade de rebrotação visando maior produtividade (kg MS por hectare).

Portanto, o sucesso dos inoculantes bacterianos em países de clima tropical é mais provável quando a forragem, estando ou não acompanhada de aditivos, suprir uma quantidade de carboidratos solúveis próxima daquelas experimentadas por gramíneas temperadas, milho e sorgo (Sollenberger et al., 2003).

Além de uma fonte adicional de carboidratos solúveis, tais como melaço, grãos de cereais, açúcar de beterraba e polpa cítrica peletizada, McDonald et al. (1991) sugerem a combinação de enzimas fibrolíticas, as quais poderiam produzir uma fermentação mais eficiente como resultado do maior aproveitamento da parede e conteúdo celular.

5.2 - Silagem de Alfafa

A alfafa (*Medicago sativa* L.) e outras leguminosas perenes têm sua importância difundida em todo o mundo, pois nos locais onde se adaptam e são corretamente manejadas, estas espécies são capazes de produzir forragem em grande quantidade com alta qualidade (Albrecht & Beauchemin, 2003). Estes autores salientam ainda que nos Estados Unidos, os inoculantes bacterianos são os principais aditivos utilizados na conservação destas leguminosas.

Rodrigues et al. (2004) avaliaram o efeito de diferentes grupos de microrganismos comerciais, em cultura de alfafa (ensilada com 19% MS), com ou sem a adição de polpa cítrica peletizada (12% MV), em silos experimentais. Os tratamentos foram representados por três inoculantes comerciais, os quais continham os seguintes microrganismos: 1) *S. faecium*, *P. acidilactici*, *L. plantarum*, amilase, hemicelulase e celulase; 2) *L. plantarum*, *S. faecium* e *Lactobacillus sp.*; 3) *S. faecium* e *L. plantarum*.

Com exceção da silagem controle, todos os inoculantes aumentaram os teores de etanol. O tratamento 3 aumentou o pH e o 2 reduziu a concentração de ácido acético. Independentemente da presença de polpa, todos os inoculantes diminuíram as perdas de MS; os tratamentos 2 e 3 diminuíram a digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e o 3 aumentou a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃). Os autores concluíram que os inoculantes contendo cepas de BAL não afetaram as concentrações dos ácidos láctico,

propiónico ou butírico, bem como a estabilidade aeróbia, independentemente da presença de polpa cítrica.

Em experimento com vacas Holandesas multiparas em estágio intermediário de lactação, alimentadas com silagem emurcheada de alfafa (50% MS), Magalhães & Rodrigues (2003) não observaram efeito da inoculação bacteriana (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*) sobre os parâmetros avaliados (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito da inoculação microbiana sobre o consumo de matéria seca, produção e composição do leite.

Parâmetros	Tratamentos			CV	Prob.
	Controle	Inoculada	Média		
CMS (kg animal ⁻¹ .d ⁻¹)	17,82	17,84	17,83	13,46	NS
CMSPV (%)	3,30	3,28	3,29	14,40	NS
Produção de leite (kg.d ⁻¹)	22,37	22,98	22,69	11,97	NS
LCG (kg.d ⁻¹)	20,41	21,00	20,69	13,99	NS
Sólidos Totais (kg.d ⁻¹)	2,65	2,74	2,69	15,84	NS

CMS = consumo de matéria seca; CMSPV = consumo de matéria seca em percentual do peso vivo; LCG = leite corrigido para gordura.

Prob. = probabilidade estatística; NS = não significativo.

Fonte: Adaptado de Magalhães & Rodrigues (2003).

A não resposta dos inoculantes, poderia ser justificada pela competição destes com a população epífita de microrganismos, em que maior destaque é dado as BAL. Assim, para que haja uma competição favorável com a os microrganismos epifíticos e, conseqüentemente, a fermentação adequada, Muck & Kung (1997) ressaltam que a inoculação deverá disponibilizar ao menos um décimo da população dessas bactérias.

A silagem com alto valor nutritivo, fato decorrente de uma fermentação satisfatória deverá também apresentar um bom valor alimentício. Porém, em alguns casos isto não têm sido observado. Provavelmente, a falta desse resultado possa ser decorrente da dose de inoculante adicionada à silagem.

Satter et al. (1991) citados por Magalhães & Rodrigues (2003) ressaltam que para melhorar o desempenho animal, utilizando a silagem de alfafa inoculada como fonte de volumoso, se faz necessário que a adição de inoculante em concentração ao menos, dez vezes maior que a população de bactérias ácido-tolerantes da forragem inicial. De acordo com Magalhães & Rodrigues (2003), a não resposta dos inoculantes, em aumento da produção de leite e demais parâmetros avaliados (Tabela 6), poderia ser justificada pela adição de uma quantidade insuficiente de BAL (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*).

Ao avaliar o mesmo inoculante (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*) em silagem emurcheada de alfafa (60% MS), Manginelli et al. (2005) concluíram que este produto para ensilagem da alfafa não se mostrou eficiente, uma vez que silagens

inoculadas não proporcionaram maior aproveitamento ou consumo de nutrientes, quando fornecidos para vacas (640 kg de PV) não-gestantes e não-lactantes (Tabela 7).

Tabela 7 - Consumo de matéria seca digestível e de NDT obtidos com dietas contendo silagens de alfafa inoculadas.

Parâmetros	Tratamentos				
	Controle	Inoculada	Média	CV	Prob.
CMSD (Kg.d ⁻¹)	11,39	12,18	11,79	17,02	NS
CMSD (% PV)	1,76	1,74	1,75	12,78	NS
CNDT (Kg.d ⁻¹)	11,40	12,38	11,89	14,05	NS
CNDT (% PV)	1,78	1,75	1,77	12,72	NS

CMSD = consumo de matéria seca digestível; CNDT = consumo de nutrientes digestíveis totais. Prob. = probabilidade estatística; N = não significativo.

Fonte: Adaptado de Manginelli et al. (2005).

5.3 - Silagem de Milho

Embora BAL homofermentativas se mostrem menos efetivas em silagens de milho, estas podem ser usadas quando o teor de umidade deste material é baixo, no caso de uma geada severa, quando a falta de chuva for prolongada (Muck & Kung, 1997).

Rodríguez et al. (2002) salientaram que os resultados obtidos com a inoculação microbiana de diferentes plantas forrageiras, para a produção de silagem, têm se mostrado conflitantes. Dentro deste contexto, foram avaliados os efeitos da inoculação (*Streptococcus faecium* e *Lactobacillus plantarum*) da planta de milho, sobre a digestibilidade aparente *in vivo* e consumo voluntário de carneiros. Segundo os autores, os dados obtidos (Tabela 8) não permitem recomendar a inoculação da planta do milho com BAL para produção de silagens.

Tabela 8 - Digestibilidade aparente da matéria seca (DAMS), consumo de matéria seca (CMS), de matéria seca digestível (CMSD) e de nutrientes digestíveis totais (CNDT) obtidos com silagem de milho inoculada.

Parâmetros	Tratamentos				
	Controle	Inoculada	Média	CV	Prob.
DAMS (%)	64,56	64,48	64,52	3,70	NS
CMS (g.d ⁻¹)	726	700	713	10,68	NS
CMSD (g.d ⁻¹)	467	451	459	9,61	NS
CNDT (g.d ⁻¹)	471	456	463	9,83	NS

Fonte: Adaptado de Magalhães et al. (2002).

Estes resultados corroboram com a constatação de Kung (2001), segundo o qual a inoculação de silagem de milho com bactérias homofermentativas tem produzido resultados menos consistentes. Este autor cita que, em uma revisão criteriosa de quatorze trabalhos publicados na América do Norte, com silagens de milho inoculadas com bactérias homoláticas, houve melhoria no desempenho de animais somente em três estudos.

Entretanto, em outra revisão feita pelo mesmo autor, verificou-se em alguns estudos, resposta significativa de animais na presença de inoculação, embora esta tenha apresentado também efeito reduzido nos tradicionais produtos da fermentação. Segundo Kung (2001), os dados sugerem que a falta de mudanças detectáveis nos produtos da fermentação não representa necessariamente a falta de eficácia do inoculante.

5.4 - Silagem de cana-de-açúcar

Atualmente, o uso da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) como volumoso suplementar para animais ruminantes, na forma de silagem, tem se mostrado uma prática interessante tanto na visão econômica quanto operacional.

De acordo com Nussio & Schmidt (2005), a conservação desta cultura na forma de silagem é um tema que vem se destacando nos últimos anos, despertando interesse crescente de produtores e pesquisadores, em função da logística que este volumoso ensilado pode apresentar.

Dependendo da espécie de bactéria envolvida no processo e do substrato utilizado, o etanol, muito comum em silagens de cana-de-açúcar, pode ser sintetizado durante a fermentação heterolática. Neste tipo de fermentação, a glicose e a frutose são degradadas pela via 6-fosfogluconato até gliceraldeído 3-fosfato e acetilfosfato.

Nussio & Schmidt (2005) ressaltaram a elevada produção de etanol, por leveduras epífitas, como sendo um dos principais entraves a confecção de silagem de cana-de-açúcar. Além de ser facilmente volatilizado, o etanol produzido acarreta em elevadas perdas de MS e redução no valor alimentício, uma vez que inibe o consumo do animal, principalmente nas primeiras horas após o fornecimento destas silagens aos animais (Schmidt et al., 2004).

Ao eleger a cana-de-açúcar como uma cultura passível de ser ensilada, os produtores devem estar cientes da necessidade de se utilizar um aditivo, o qual deverá inibir a população de levedura e/ou bloquear a via fermentativa de produção de álcoois (Nussio & Schmidt, 2005).

Como explorado anteriormente, fica evidente que a utilização de inoculantes contendo BAL homofermentativas, desejáveis em silagens de gramíneas (tropicais e temperadas), leguminosas e de milho, tem sido evitada em silagem de cana. Tal fato se explica pela grande produção de ácido láctico como resultado desta fermentação homolática, que é usado como substrato pelas leveduras para síntese de etanol.

Dentro deste contexto, a utilização de bactérias heteroláticas, em especial *Lactobacillus buchneri*, não produtoras de etanol na fermentação anaeróbia da glicose, é algo desejável (McDonald et al., 1991). A ausência da enzima acetaldéido desidrogenase confere esta característica às bactérias. Sendo assim, a glicose será fermentada a acetato,

cuja função antifúngica é reconhecida.

Em experimentos de desempenho, Schmidt et al. (2003) trabalhando com novilhos da raça Canchim e Nelore, bem como de Pedroso (2003) avaliando novilhas da raça Holandesa que receberam como única fonte de volumoso a silagem de cana-de-açúcar submetida a vários aditivos, concluíram ter havido melhor desempenho dos animais alimentados com silagens inoculadas com *L. buchneri*. O diferencial no ganho médio diário dos novilhos foi de 0,26 kg.dia⁻¹ e das novilhas 0,24 kg.dia⁻¹ em relação aos animais que receberam silagens não inoculadas.

6 - Metodologia na avaliação de aditivos

Respeitando as diversas nuances envolvendo o processo de avaliação de aditivos bacterianos, pode-se sumarizar três etapas comumente envolvidas: a) avaliação microbiológica, b) ensaio em silos laboratoriais, c) experimentos em escala comercial envolvendo desempenho animal.

6.1 - Avaliação microbiológica

Dentre os inúmeros trabalhos envolvendo conservação de forragem, é possível notar que a avaliação microbiológica dos aditivos se faz pertinente principalmente nas seguintes etapas: avaliação da viabilidade do microrganismo ou de sua população após a fermentação.

A avaliação da viabilidade refere-se ao número de unidades formadoras de colônia (UFC) viáveis por quantidade do produto. Principalmente em trabalhos científicos, onde o rigor com as informações é fundamental, essa prática deveria ser adotada como padrão.

Grande número de trabalhos citam as concentrações recomendadas pelo fabricante do produto, sem com isso checar tal informação. A não contagem de UFC do produto pode incorrer no erro de se atribuir um resultado obtido, cientificamente, a uma população de microrganismos ativos, ao qual não condiz com a população microbiana obtida a campo, por meio do uso do produto comercial.

Segundo Nishino (2003), a determinação e quantificação dos microrganismos existentes após o processo fermentativo podem explicar a composição de ácidos orgânicos e seu efeito na qualidade final da silagem, inclusive a estabilidade aeróbia. O número final de leveduras, fungos e bactérias (diferentes grupos) servem como referência aos dados obtidos sobre a composição química.

As avaliações microbianas são realizadas utilizando-se meios de cultura específicos para determinados grupos de bactérias e leveduras. Kung (1992) e Adesogan (2003) descreveram resumidamente o processo de avaliação microbiana nos seguintes passos:

- homogeneização da amostra de silagem em extrato aquoso;
- diluições sucessivas do extrato em solução tampão;
- adição de alíquotas dessas diluições às placas de Petri contendo os respectivos meios;
- crescimento dos microrganismos nas placas incubadas sob temperatura constante.

6.2 - Ensaio em silos laboratoriais

Os silos laboratoriais são recursos dos quais a pesquisa se utiliza quando há a necessidade de se avaliar o efeito de diversos tratamentos, sendo estes constituídos por diferentes aditivos, ou até diferentes concentrações de um mesmo aditivo.

Segundo Ohyama (1988) diferentes tipos de silos laboratoriais com diferentes capacidades, formas e materiais foram e vêm sendo utilizados nas pesquisas envolvendo conservação de forragem. De acordo com a classificação sugerida por Ohyama, silos com capacidade variando de 100 a 1000 kg são considerados de grande escala (McDonald & Attwood, 1958 citado por Ohyama, 1984). Estes silos apresentam vantagem por se assemelharem às condições obtidas nos silos comerciais. Contudo, sua utilização é restrita, devido à grande quantidade de forragem necessária, custo mais elevado e pouco práticos no momento do manuseio.

No Brasil é comum a utilização de tambores de até 200 L como silos experimentais. Rodrigues et al. (2002) utilizaram bombonas plásticas de 200 L revestidas por saco plástico transparente na avaliação do efeito do *L. plantarum* e do *Streptococcus faecium* sobre o valor nutritivo da silagem de milho.

Silos de média escala (20 a 100 L) são mais comuns pelo fato de serem mais baratos, facilmente manejados, não necessitarem de grandes quantidades de material e permitirem a elaboração de experimentos com grande número de tratamentos. Alguns pesquisadores têm avaliado o processo fermentativo em silagens de gramíneas tropicais, utilizando silos experimentais com 20 L de capacidade (Mari, 2003; Pedroso, 2003; Ribeiro et al., 2004 e Loures, 2004).

Estes silos são representados por baldes plásticos com tampas apropriadas (garantindo a vedação completa). Na tampa é adaptada uma válvula de escape do tipo Bunsen para saída espontânea dos gases. No fundo de cada silo são colocados uma camada de material absorvente, uma tela fina de plástico e um pano, de maneira a permitir a drenagem e quantificação do efluente produzido. Silos de menor capacidade também são usados, contudo a quantidade limitada de material impede análises de pós-abertura, sendo então destinados a avaliar o efeito dos aditivos sobre as características químico-bromatológicas da silagem.

Muck (2002) trabalhou com silagem de milho inoculada com *L. buchneri* em silos feitos de PVC com capacidade entre 1,5 a 2,0 kg. Os silos eram vedados com tampas pretas de borracha. Weinberg (1995) trabalhou com recipientes de vidro com capacidade de 1,5 L para avaliar o efeito de bactérias ácido propiónicas sobre as silagens de sorgo e trigo. Kung Jr et al. (2003) reportaram resultados consistentes na avaliação de aditivos para silagens de alfafa em silos laboratoriais de polivinil (0,023 x 0,064m) compactados com prensa hidráulica até atingir 250kg MS/m³.

Os silos experimentais se constituem em uma maneira menos onerosa de realizar experimentos com muitos tratamentos. Respalda por um ambiente de melhor controle, estes silos tornam-se um instrumento interessante para a pré-seleção dos aditivos.

Entretanto, deve-se ter cuidado para inferir dados obtidos em silos experimentais para uma escala comercial, pois neste caso, dificilmente haverá um ambiente totalmente

controlado e favorável. Neste sentido, faz-se necessária a última etapa da avaliação de um aditivo, na qual será delineado um experimento em escala comercial envolvendo a participação de animais.

6.3 - Experimentos em escala comercial com desempenho animal

Pedroso (2003) avaliou aditivos químicos e microbianos no controle de perdas e na qualidade de silagem de cana-de-açúcar. Inicialmente, em escala de silos experimentais (balde plásticos de 20 L), o autor impôs tratamentos químicos e microbiológicos *L. plantarum* e *L. buchneri* nas concentrações de 1×10^6 e $3,64 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ de forragem verde, respectivamente.

Dentre todos os tratamentos foi verificado que uréia, benzoato de sódio e o *L. buchneri* responderam positivamente aos parâmetros avaliados. A uréia diminuiu a concentração de etanol e aumentou a DIVMS, o benzoato de sódio e o *L. buchneri* diminuíram a concentração de etanol na silagem e também propiciaram melhor estabilidade aeróbia, sendo esta característica fundamental na adoção desse tipo de silagem.

Com base nos dados obtidos nos experimentos em balde, um experimento de desempenho utilizando novilhas Holandesas foi elaborado com os aditivos que propiciaram os melhores resultados durante a avaliação anterior (uréia, benzoato de sódio e *L. buchneri*) os quais foram confrontados com o tratamento controle.

Após avaliação de 60 dias, o autor concluiu que os tratamentos representados pelo benzoato de sódio e *L. buchneri* resultaram em aumento de ganho de peso diário em 21 e 32%, respectivamente. Também houve melhor conversão alimentar nestes dois tratamentos (7,63 e 7,72, respectivamente) quando comparada ao grupo que recebeu a silagem controle (9,37).

Os silos experimentais podem auxiliar na escolha dos tratamentos que seriam direcionados para experimentos mais caros e, como são os experimentos de desempenho de animais. É importante frisar que a última etapa de avaliação é fundamental, pois é a comprovação da eficiência dos aditivos frente ao desafio que sofreram, quando na forma comercial. As avaliações comerciais são fundamentais para a recomendação destes aditivos de silagens para o seguimento de produção.

7 - Protocolo para desenvolvimento de aditivos

O desenvolvimento de novos aditivos decorre da necessidade de se obter avanços quanto à manutenção da qualidade da forragem e o controle de perdas inerentes à etapa de fermentação e pós-abertura do silo. O processo de obtenção de um produto bacteriano capaz de inibir sobre tais características não é realizado de maneira aleatória, mas sim pela percepção de características desejáveis encontradas nos diferentes tipos de microrganismos e da ação destes sobre as silagens confeccionadas.

Como exemplo, problemas detectados após a abertura dos silos, os quais geram perdas qualitativas e quantitativas, trouxeram ao meio científico a necessidade de se desenvolver aditivos capazes de reverter ou amenizar tal situação.

Nos últimos anos uma série de estudos feitos com *L. buchneri* têm comprovado sua eficácia em aumentar a estabilidade aeróbia por meio de uma maior síntese de ácido acético. Este ácido tem características antifúngicas conhecidas desde 1983, quando Moon realizou experimentos clássicos relacionando o efeito dos ácidos com a conservação de alimentos.

Tendo em vista a melhoria da estabilidade aeróbia em silagem de milho, Driehuis et al. (1999) realizaram quatro experimentos avaliando diferentes concentrações de *L. buchneri*. Os resultados obtidos mostraram que o uso do inoculante foi acompanhado por aumento de estabilidade muito além do esperado (Tabela 9).

Tabela 9 - Composição e estabilidade aeróbia de silagens controle e tratadas com 1×10^6 UFC de *L. buchneri* PW01 após 92 dias da ensilagem, em silos do tipo bag.

	Controle	Inoculante	DP	P
pH	3,76	4,38	0,007	****
N-NH ₃ (g.kg ⁻¹ N)	84	112	4,8	****
Bactérias Ácido Láticas (log UFC.g ⁻¹)	8,3	9,2	0,1	*
Leveduras (log UFC.g ⁻¹)	5,7	<2,0	0,34	**
Bactéria Aceto Ácida (log UFC.g ⁻¹)	<2,0	<2,0	-	NS
Estabilidade Aeróbia (h)	43	>792	0,5	****
Composição MS (mmol.kg ⁻¹)				
Ácido Láctico	768	99	25	**
Ácido Acético	327	1005	97,8	*
Ácido Propiônico	11	113	9,6	**
Etanol	223	401	36,7	*
1-Propanol	5	207	16,6	**

DP = Desvio padrão da média; P = Probabilidade.

NS = não significativo; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001.

Fonte: Driehuis et al. (1999).

As análises químico-bromatológicas indicaram diminuição no teor de ácido láctico que era convertido para ácido acético e teoricamente 1,2-propanodiol (Tabela 10). Contudo, este se mostrou em concentrações cada vez mais baixas em função do aumento nas concentrações de *L. buchneri*. De alguma maneira, assim como mencionado por Driehuis et al. (1999), o aditivo ou outro microrganismo estava convertendo o 1,2-propanodiol em 1-propanol mais ácido propiônico.

Tabela 10 - Composição e perdas de matéria seca (MS) da silagem controle e tratada com diferentes concentrações de *L. buchneri*.

	Concentração do inoculante				P.
	Controle	1 x 10 ³	1 x 10 ⁴	1 x 10 ⁶	
pH	3,64 ^c	3,67 ^c	3,70 ^c	4,28 ^a	***
Perdas de MS (g.kg ⁻¹)	13,7 ^c	13,9 ^c	15,2 ^c	38,7 ^b	***
N-NH ₃ (g.kg ⁻¹ N)	90 ^b	92 ^b	92 ^b	112 ^a	**
Composição MS (mmol.kg ⁻¹)					
Ácido láctico	880 ^a	831 ^a	716 ^c	358 ^c	***
Ácido Acético	260 ^d	272 ^d	348 ^c	591 ^b	***
Ácido Propiónico	9,0 ^c	0 ^c	10,0 ^c	43,0 ^b	***
Etanol	180	177	179	193	NS
1-Propanol	21 ^d	28 ^d	63 ^c	200 ^b	***

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05).
 DP = Desvio padrão da média; P = Probabilidade.
 NS = não significativo; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001.
 Fonte: Driehuis et al. (1999).

O ácido propiónico em combinação com o ácido acético apresenta um efeito de sinergismo capaz de explicar os valores elevados de estabilidade (Tabela 9) e, conseqüente longevidade da silagem (Moon, 1983).

Kung (2001) trabalhando com *Propionibacterium* (bactérias produtoras de ácido propiónico) concluiu que esses microrganismos não são capazes de competir com a população epifítica e se manter no meio, o que foi constatado pela não elevação da concentração de ácido propiónico de maneira consistente nas silagens.

Trabalhando com os dados obtidos por Driehuis (1999), Krooneman et al. (2002) repetiram condições semelhantes na confecção das silagens experimentais. Utilizando-se de técnicas avançadas de biotecnologia, como sequenciamento genômico, PCR e comparação de DNA, aliadas às análises microbiológicas convencionais, como meio de cultura contendo somente o substrato específico (neste caso o 1,2-propanodiol), os pesquisadores conseguiram isolar e classificar uma nova cepa de *Lactobacillus*, a qual deram o nome de *L. diolivorans* (Figura 1), cuja atuação pode ser descrita segundo a equação:

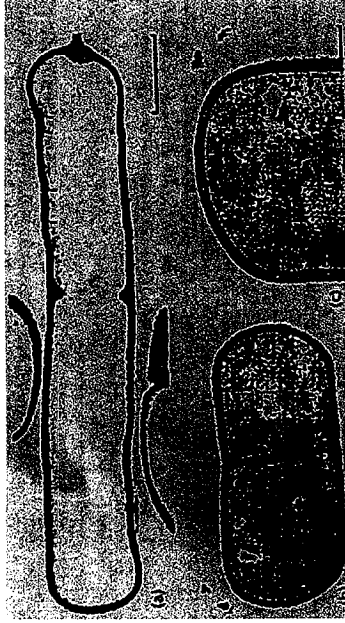
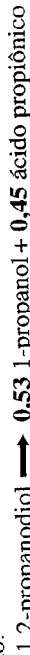


Figura 1 - Microscopia eletrônica do crescimento de *L. diolivorans* em glicose (a), 1,2-propanodiol (b) e estrutura da parede celular (c). Adaptado de Krooneman et al. (2002).

Outra técnica utilizada na seleção de aditivos consiste na utilização de algoritmos genéticos, como proposto por Davies (2000). O autor trabalhou com cerca de 50 tratamentos por geração de microrganismo, sendo que cada tratamento se constituía em diferentes combinações de 8 cepas de bactérias e diversos tipos de aditivos, em seis diferentes níveis de adição.

O autor sugere que características de interesse sejam usadas para o cálculo de uma medida que possa, juntamente com uma variável custo, auxiliar na classificação dos melhores microrganismos. As características de interesse envolvem, por exemplo, a concentração de ácido láctico, a diminuição do pH, além da concentração de aminoácidos. Por fim, os últimos 50 tratamentos (quinta geração com os melhores aditivos, mutantes e recombinações) obtiveram concentrações de ácido láctico até 4,6 vezes superiores ao controle.

O desenvolvimento de aditivos ou a simples descoberta de novos microrganismos de interesse são resultantes de um evento não aleatório, mas decorrentes da capacidade de profissionais treinados e capazes de perceber avanços em relação a problemas específicos.

8 - Ação de inoculantes após a abertura dos silos

Muck & Kung (1997) verificaram em uma de suas revisões efeito inconsistente dos inoculantes contendo BAL homofermentativas, sobre a estabilidade aeróbicas silagens. A razão deste achado inclui o fato do ácido láctico, isoladamente, não exercer ação antifúngica eficiente, além da redução da síntese de ácido acético, devido a fermentação homolática predominante. Nestas condições, o resultado mais provável é a proliferação de leveduras durante o armazenamento e exposição aeróbia pós-abertura.

A menor estabilidade aeróbia das silagens nos cochos é esperado, quando o inoculante utilizado contém exclusivamente BAL homofermentativas. Alguns poucos

produtores adquirem estes inoculantes por constatarem resultados positivos de estabilidade. Kung Jr. (2001) ressalta que silagens tratadas com bactérias homofermentativas podem ser estáveis, caso a prática de alimentação e o manejo do sítio forem adequados. Porém, o número de produtores que utilizam silagem e, dominam esta tecnologia, ainda é restrito, o que condiciona a busca de novos aditivos capazes de melhorar a estabilidade pós-abertura.

Outras espécies de microrganismos têm sido usadas como inoculante com o intuito de melhorar a estabilidade aeróbia das silagens. Kung Jr. (2001) destacou, como exemplo, a *Propionibacteria* por sua habilidade em converter ácido láctico e glicose em ácido acético e propiônico, os quais exercem maior ação antifúngica. Porém, um dos motivos do menor interesse em se utilizar estes microrganismos resume-se ao fato destes apresentarem atividade proteolítica, além do fato de serem estritamente anaeróbios, com crescimento lento e relativamente intolerantes ao acúmulo de ácidos orgânicos no ambiente.

Atualmente, a bactéria *L. buchneri* é o microrganismo comercial que apresenta maior potencial em melhorar a estabilidade aeróbia das silagens. Onde Elferink et al. (1999) estudando bactérias heterofermentativas, observaram que as bactérias *L. buchneri* são capazes de metabolizar o ácido láctico a ácido acético e 1,2-propanodiol, além de reduzirem o crescimento e a sobrevivência de leveduras e melhorar a estabilidade aeróbia de diferentes silagens de milho. Todavia, o estudo de Driehuis et al. (1999) mostrou que os inoculantes contendo cepas de *L. buchneri*, apesar de terem melhorado a estabilidade aeróbia, em condições de laboratório, não se traduziram em efeito positivo na ingestão de alimento e desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagem de milho.

Em dados obtidos por Kung & Ranjit (2001), a silagem de cevada (*Hordeum vulgare* L.) com 39,4% de MS e inoculada com diferentes doses de *L. buchneri* e enzimas (1×10^5 , 5×10^6 e 1×10^8 UFC/g¹ forragem verde) apresentou menor pH e maior teor de ácido acético e propiônico que aquela não inoculada. No entanto, a silagem inoculada com bactérias homoláticas e enzimas apresentou menor concentração de N-NH₃, FDN, FDA e pH, porém maior concentração de ácido láctico quando comparada à silagem não inoculada.

Os melhores resultados de estabilidade aeróbia foram observados nos tratamentos contendo doses intermediárias e altas de *L. buchneri*, nos quais a silagem se manteve estável por mais de 720 horas, enquanto as silagens inoculadas com *L. plantarum* e não inoculadas se tornaram instáveis com 155 e 376 horas, respectivamente (Figura 2).

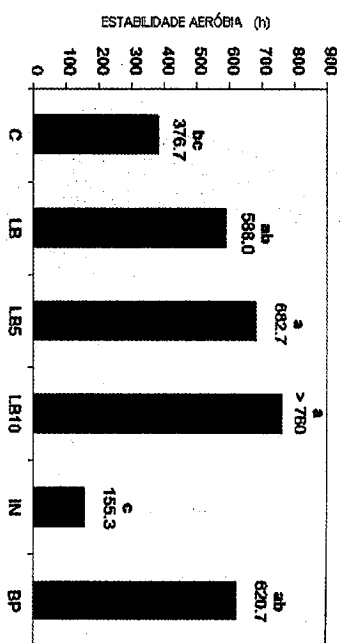


Figura 2 - Efeito dos aditivos na estabilidade aeróbia da silagem de cevada após 69 dias da ensilagem. Adaptada de Kung & Ranjit (2001).

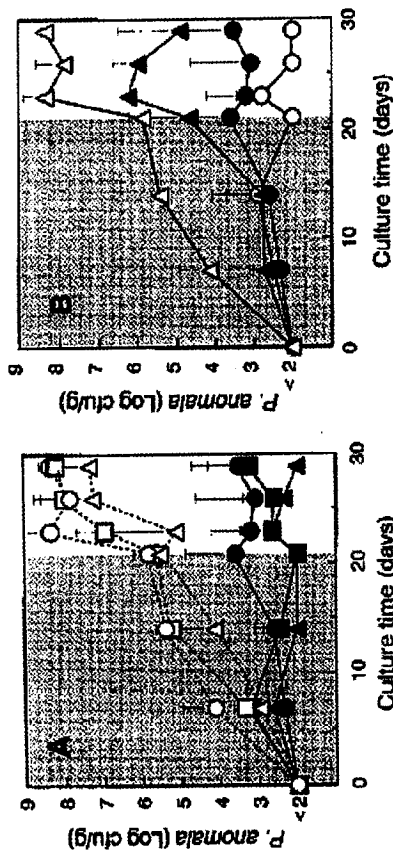
C = silagem não tratada; LB = *L. buchneri* em 1×10^5 UFC/g forragem verde e enzimas; LB5 = *L. buchneri* em 5×10^5 UFC/g e enzimas; LB10 = *L. buchneri* em 1×10^6 UFC/g e enzimas; IN = inoculantes contendo *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* em 1×10^5 UFC/g e *Propionibacterium freudenreichii* em 1×10^6 UFC/g e enzimas; e BP = aditivo tamponante a base de propionato em 0,2% da forragem verde.

9 - Perspectivas dos inoculantes microbianos

Os resultados promovidos pela inoculação têm se mostrado muitas vezes inconsistentes, sobretudo, se analisada como respostas segmentadas do processo fermentativo ou do desempenho de animais. Porém, o mercado destes produtos encontra-se em grande expansão, o que pode ser observado pelo número crescente de empresas multinacionais atuando neste setor no país.

Estudos envolvendo engenharia genética e seleção de microrganismos geneticamente modificados, visando a produção comercial de inoculantes microbianos delineados especificamente para vários padrões de silagem é algo concreto. Hoje, uma das maiores preocupações em conservação de forragem está relacionada à estabilidade aeróbia pós-abertura. Além dos aditivos já consagrados, estão sendo estudados alguns microrganismos capazes de melhorar a estabilidade aeróbia das silagens, por apresentarem proteínas letais a certas espécies de leveduras.

Kitamoto et al. (1999) propuseram um novo processo de inclusão de modificadores genéticos controladores de leveduras. Trata-se de um microrganismo denominado *Kluyveromyces lactis* variedade PCK27. Após avaliar a estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com esta variedade, os autores verificaram resultados benéficos, como mostra a Figura 3.



(A) Variedade alva *P. anomala* AHU 3936 (○, ●), A. HU 3937 (Δ, ▲) e AHU 3938 (□, ■). Símbolos vazios referem -se apenas a cultura de levedura e os cheios a associação do microrganismo PCK27; e a variedade de levedura alva.
(B) Mislura de culturas com *K. lactis* m8 (▲), *K. lactis* IFO1267 (○), *K. lactis* PCK27 (●) e sem *K. lactis* (Δ).

Figura 3 - Curva de crescimento da variedade *Pichia anomala* associada à variedade *K. lactis* em modelo de fermentação de silagem de milho. A área sombreada indica condição anaeróbia e a branca condição aeróbia. Adaptada de Kitamoto et al. (1999).

Porém, Kitamoto et al. (1999) ressaltam que a variedade *K. lactis* não é efetiva em evitar a deterioração aeróbia em todas as silagens, pois outras espécies de leveduras, bem como populações de microrganismos podem causar deterioração. As condições físicas e químicas da forragem a ser ensilada também devem interferir nestes resultados. Outros estudos contendo esses microrganismos são necessários, sobretudo para elucidar o papel das proteínas moduladoras de crescimento de leveduras.

No Brasil, o interesse envolvendo a inoculação de grupos distintos de microrganismos (bactérias ácido lácticas homo e heterofermentativas), em silagens de gramíneas tropicais, está em início de avaliação em instituições do governo estadual de São Paulo (USP/Piracicaba e UNESP/Jaboticabal). A esperança dos pesquisadores, com esta associação, está pautada na melhoria do processo fermentativo, papel desempenhado pelas bactérias homofermentativas e, na seqüência, na manutenção mais eficiente da qualidade da silagem fornecida no cocho, função das bactérias heterofermentativas.

Filya (2003) avaliou o efeito do *L. buchneri* isolada ou combinada com BAL homofermentativas (1×10^6 UFC/g), na fermentação, degradabilidade ruminal e estabilidade aeróbia de silagens de trigo, sorgo e milho. Maiores concentrações de ácido acético foram verificadas nas silagens inoculadas com *L. buchneri* e *L. buchneri* acrescido de *L. plantarum* quando comparadas à silagem controle ou inoculada somente com *L. plantarum*. A ação antifúngica deste ácido prejudicou a atividade de leveduras, o que resultou em melhor estabilidade aeróbia para estes tratamentos.

A combinação de bactérias homo e heteroláticas favorece a redução dos valores de pH, $N-NH_3$ e as perdas fermentativas. No entanto, não houve efeito destes inoculantes sobre a degradabilidade *in situ* da MS, matéria orgânica e FDN. Ribeiro et al. (2004), ao avaliarem o capim Marandu, também não verificaram efeito significativo dos inoculantes bacterianos (*L. plantarum* e *L. buchneri*) sobre os teores de fibra e, consequentemente, digestibilidade MS.

Loures (2004), trabalhando com capim Tanzânia observou que as enzimas fibrolíticas associadas ou não à inoculação bacteriana propiciaram maior degradação de alguns componentes da parede celular, porém, esse fato não favoreceu o incremento da digestibilidade da MS. Portanto, não se deve esperar ganhos consideráveis em valor nutritivo de silagem inoculadas com BAL.

Filya et al. (2004) utilizaram a mesma metodologia de Filya (2003) para avaliar a fermentação e estabilidade aeróbia das silagens de trigo, sorgo e milho. Neste estudo os autores estudaram o efeito da *Propionibacterium acidipropionici*, estando ou não associada a *Lactobacillus plantarum*. Como era esperado, a inoculação com *P. acidipropionici* aumentou significativamente as concentrações de ácido acético e propiônico quando comparada aos demais tratamentos. A maior estabilidade aeróbia foi atribuída a este tratamento, onde também houve redução da produção de CO_2 em todas as silagens.

O efeito sinérgico verificado por Filya (2003), ao associar bactérias homo e heteroláticas, não se repetiu quando *Propionibacterium acidipropionici* e *Lactobacillus plantarum* foram combinadas (Filya et al., 2004). Este fato sugere que a combinação entre microrganismos deve ser precisamente avaliada, para a recomendação definitiva ao mercado.

Finalmente, recomendações no uso de inoculantes em silagens deverão ser baseadas não apenas nos resultados de pesquisas científicas, mas também considerar os aspectos econômico (McDonald et al., 1991).

10. Referências Bibliográficas

- ADESOGAN, A. T.; SALAWU, M.B.; ROSS, A. B. et al. Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* inoculants, or chemical additive on the fermentation, aerobic stability, and nutritive value of crimped wheat grains. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.1789-1796, 2003.
- ALBRECHT, K.A.; BEAUCHEMIN, K.A. Alfafa and other perennial legume silage. In: SILAGE SCIENCE AND TECHNOLOGY. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, 2003. p.633-664.
- BOLSEN, K.K.; ASHBELL, G.; WILKINSON, N. Silage additives. In: CHESSON, A.; WALLACE, R.J. (Ed.). *Biotechnology in animal feeds and animal feeding*. Weinheim: VCH Press, 1995. p.33-34.
- COELHO, E.M.; ITAVO, L.C.V.; MIGLIANO, L.C.B. et al. Uso de aditivos absorventes para confecção de silagem de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum cv. Napier) (compact disc). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., Santa Maria, 2003. *Anais*. Santa Maria: SBZ, 2003.
- DAVIES, Z.E.; GILBERT, R.J.; MERRY, R.J. et al. Efficient improvement of silage additives by using genetic algorithms. *Applied and environmental microbiology*, v.64, n.4, p.1435-1443, 2000.
- DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S.J.W.H.O.; VAN WIKSELAAR, P.G. et al. *Lactobacillus buchneri*

- improves aerobic stability of laboratory and farm scale whole crop maize silage but does not affect feed intake and milk production of dairy cows. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 12., Uppsala, 1999. **Proceedings**. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1999b. p.264-265.
- FLIXA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.1080-1086, 2003.
- FLIXA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.818-826, 2004.
- LOURES, D.R.S. Enzimas fibrolíticas e emulcimento no controle de perdas da ensilagem e na digestão de nutrientes em bovinos alimentados com rações contendo silagem de capim Tanzânia. Piracicaba, 2004. 146p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- KITAMOTO, H.K.; HASEBE, A.; OHMOMO, S. et al. Prevention of aerobic spoilage of maize silage by a genetically modified killer yeast, *Kluyveromyces lactis*, defective in the ability to grow on lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p.4697-4700, 1999.
- KROONEMAN, J.; FABER, F.; ALDERKAMP, A.C. et al. *Lactobacillus diobrovus* sp. Nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.639-646, 2002.
- KUNIG JR., L. **Standard operating procedure**. University of Delaware, 1992.
- KUNIG JR., L. Aditivos microbianos e químicos para silagem - Efeitos na fermentação e resposta animal. In: **WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM**, 2., Piracicaba, 2000. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p.53-73.
- KUNIG JR., L.; RANUIT, N.K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1149-1155, 2001.
- KUNIG JR., L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. **Silage Additives**. In: **SILAGE SCIENCE AND TECHNOLOGY**. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, 2003. p.305-360.
- KUNIG JR., L.; TAYLOR, C.C.; LYNCH, M.P.; NEYLON, J.M. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.336-343, 2003.
- MAGALHÃES, V.J.A.; RODRIGUES, P.H.M. Desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com silagem pré-seca de alfafa adicionada de inoculante microbiano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.2016-2022, 2003.
- MANGINELLI, S.; MAGALHÃES, V.J.A.; RODRIGUES, P.H.M. Inoculação microbiana da alfafa para silagem sobre a digestibilidade total e ruminal em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.926-933, 2005.
- MARI, L.J. Intervalo entre cortes em capim-maranandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf cv. Marandú): produção, valor nutricional e perdas associadas à fermentação da silagem. Piracicaba, 2003. 138p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Mallow: Chalcombe Publications, 1991. 340p.
- MUCK, R.E. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. In: **ASAE Annual International Meeting/ CIGR World Congress**, XV., Chicago, 2002.
- MUCK, R.E.; KUNIG, L.Jr. Effects of silage additives on ensiling. In: **SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK**. NRAES-99, Herchey, 1997. **Proceedings**. Herchey, NRAES, 1997. p.187-199; 200-210.
- MOON, N. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, v.55, p.453-460, 1983.
- NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H.; SAKAGUCHI, E. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus*

RIBEIRO et al.

- buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.800-807, 2003.
- NUSSIO, L.G.; SCHMIDT, P. Silagens de cana-de-açúcar para bovinos leiteiros: aspectos agrônomicos e nutricionais. In: **Simpósio sobre Bovinocultura Leiteira**, 5., Piracicaba, 2005. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.193-218.
- OHYAMA, Y. Measuring silage management trough research. In **Silage Management**. Kansas, 1984, p.18-41.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; DREHUTS, F.; KROONEMAN, J. et al. *Lactobacillus buchneri* can improve the aerobic stability of silage via a novel fermentation pathway: the anaerobic degradation of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol. In: **INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE**, 12., Uppsala, 1999. **Proceedings**. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1999. p.266-267.
- PEDROSO, A. de F. Aditivos químicos e microbianos no controle de perdas e na qualidade de silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). Piracicaba, 2003. 120p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- RIBEIRO, J.L.; NUSSIO, L.G.; MARI, L.J. et al. Avaliação do valor nutritivo da silagem de capim Marandú submetido aos efeitos do teor de matéria seca, da estação do ano e da presença de inoculante bacteriano (compact disc). In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 41., Campo Grande, 2004. **Anais**. Campo Grande: SBZ, 2004.
- RODRIGUES, P.H.M.; ANDRADE, S.J.T.; RUZANTE, J.M. et al. Valor nutritivo da silagem de milho sob o efeito da inoculação de bactérias ácido-láticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2380-2385, 2002.
- RODRIGUES, P.H.M.; ALMEIDA, L.F.S.; LUCCI, C.S. et al. Efeitos da adição de inoculantes microbianos sobre o perfil fermentativo da silagem de alfafa adicionada de polpa cítrica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1646-1653, 2004.
- ROTH, A.P.T.P.; BERNARDES, T.F.; REIS, R.A. et al. Avaliação da composição química durante a fermentação de silagens de capim-Maranandú (*Brachiaria brizantha* cv. Marandú) tratadas com aditivos químicos e inoculantes bacterianos. In: **Congresso de Forragicultura e Pastagens**, 1., Lavras, 2005.
- SCHMIDT, P.; NUSSIO, L.G.; RIBEIRO, J.L. et al. Performance of beef bulls fed sugar cane silage (*Saccharum officinarum* L.) treated with *Lactobacillus buchneri* (compact disc). In: **WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION**, 9., Porto Alegre, 2003. **Proceedings**. Porto Alegre: UFRGS, 2003.
- SCHMIDT, P.; NUSSIO, L.G.; SANTOS, M.C. et al. Comportamento ingestivo de bovinos alimentados com silagens de cana-de-açúcar com doses de *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788 (compact disc). In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 41., Campo Grande, 2004. **Anais**. Campo Grande: SBZ, 2004.
- SOLLENBERGER, L.E.; REIS, R.A.; NUSSIO, L.G. **Conserved forage**. In: **WARM SEASON GRASSES**. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, 2004. p.355-387.
- TANAKA, O.; OHMOMO, S. Effect in inoculant with *Lactobacillus curvatus* on ensiling. **Grassland Science**, v.46, p.148-152, 2000.
- WEINBERG, G.C.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; AZRIELI, A. The effect of a propionic acid bacterial inoculant applied at ensiling on the aerobic stability of wheat and sorghum silages. **Journal of Industrial Microbiology**, v.76, p.493-497, 1995.
- WILKINSON, J.M.; BOISEN, K.K.; LIN, C.J. **History of silage**. In: **SILAGE SCIENCE AND TECHNOLOGY**. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, 2003. p.1-30.
- WINTERS, A.L.; MERRY, R.J.; MULLER, M. et al. Degradation of fructans by epiphytic and inoculant lactic acid bacteria during ensiling of grass. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.304-312, 1998.
- WOOLFORD, M.K. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C₁-C₁₂) as potential silage additives. **Journal of Science Food Agriculture**, v.26, p.219-228, 1975.
- WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. 350 p.