

Avaliação de Inoculante Microbiano na Composição Bromatológica, Fermentação e Estabilidade Aeróbia da Silagem Pré-Seca de Alfafa¹

Vanessa Jaime de Almeida Magalhães², Paulo Henrique Mazza Rodrigues³

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do inoculante microbiano Silobac[®] (*L. plantarum*, *P. pentosaceus*), na silagem pré-seca de alfafa, em 22 silos, distribuídos em dois tratamentos, sendo 11 silos com inoculante e 11 controle, segundo o delineamento inteiramente casualizado. A alfafa foi cortada quando em estágio do meio do florescimento e os silos, confeccionados com aproximadamente 600 kg e revestidos com película de PVC branca. Amostras foram coletadas, logo após a abertura de cada silo, para análise bromatológica e perfil fermentativo. O inoculante diminuiu o teor de MS (inoculada = 44,7 vs. controle = 51,2%) e aumentou a concentração de ácido acético (2,35 vs. 0,89% MS), em relação ao grupo controle. O inoculante também revelou diminuição no escore de bolor obtido a 10 cm de profundidade, mas não a 30 ou 50 cm. Não foram observados efeitos sobre os teores de PB (15,9 vs. 16,4% MS), NIDN (14,7 vs. 16,2% do N total), NIDA (11,2 vs. 11,6% do N total), FDN (47,1 vs. 46,7% MS), FDA (40,2 vs. 39,8% MS), celulose (29,7 vs. 28,6% MS), hemicelulose (6,94 vs. 6,89% MS), LDA (10,4 vs. 11,1% MS), carboidratos solúveis (2,97 vs. 2,44% MS) e amido (0,82 vs. 0,69% MS), DIVMS (61,6 vs. 62,5% MS), poder tampão (52,9 vs. 51,7 meq./100g MS), as concentrações de etanol (0,018 vs. 0,024% MS) e dos ácidos propiônico (0,00 vs. 0,00% MS), butírico (0,00 vs. 0,00% MS) e láctico (5,62 vs. 4,45% MS), a relação láctico:acético (4,57 vs. 4,87), bem como sobre o pH (4,96 vs. 5,33), as concentrações de N-NH₃ (8,19 vs. 5,21% do N total) e a estabilidade aeróbia.

Palavras-chave: ácidos orgânicos, bactérias lácticas, *Medicago sativa*

Evaluation of Microbial Inoculant on Chemical Composition, Fermentation Characteristics and Aerobic Stability of Alfalfa Haylage

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the effects of microbial inoculant Silobac[®] (*L. plantarum*, *P. pentosaceus*) on alfalfa haylage, in twenty-two big bales, allotted to two treatment, eleven with inoculant and eleven control, assigned to a totally randomized design. Alfalfa crop was harvested at middle bloom stage and conditioned in silage bales of about 600 kg capacity and covered with white tube plastic film. Silage was sampled to proceed chemical analyses after each silo was opened. The inoculation decreased DM content (inoculated = 44.7 vs. control = 51.3%) and increased acetic acid content (2.35 vs. 0.89% DM), compared to control. Inoculant also showed decreasing mould on depth 10 cm, but not on depth 30 or 50 cm. Treatments did not influence crude protein (15.9 vs. 16.4% DM), NDIN (14.7 vs. 16.2% of total N), ADIN (11.2 vs. 11.6% of total N), NDF (47.1 vs. 46.7% DM), ADF (40.2 vs. 39.8% DM), cellulose (29.7 vs. 28.6% DM), hemicellulose (6.94 vs. 6.89% DM), ADL (10.4 vs. 11.1% DM), WSC (2.97 vs. 2.44% DM) and starch contents (0.82 vs. 0.69% DM), IVDMD (61.6 vs. 62.5% DM), buffering capacity (52.9 vs. 51.7 meq./100g DM), ethylic alcohol (0.018 vs. 0.024% DM), propionic (0.00 vs. 0.00% DM), butyric (0.00 vs. 0.00% DM) and lactic acids contents (5.62 vs. 4.45% DM), lactic:acetic ratio (4.57 vs. 4.87), pH (4.96 vs. 5.33), NH₃-N content (8.19 vs. 5.21% of total N) or aerobic stability.

Key Words: lactic acid bacteria, organic acids, *Medicago sativa*

Introdução

O princípio da fermentação da silagem é alcançar uma quantidade de ácido láctico suficiente para inibir o crescimento de microorganismos indesejáveis, melhorando, assim, a preservação dos nutrientes da forragem. Normalmente, o número de bactérias ácido-láticas presentes nas forragens é baixo

(Speckman et al., 1981; Woolford, 1984; Muck, 1989), incluindo espécies heterofermentativas (Lindgren et al., 1983; Muller et al., 1991).

A espécie forrageira, o conteúdo de matéria seca, o substrato disponível, a capacidade de tamponamento e, principalmente, o número de espécies de bactérias anaeróbias presentes no processo de ensilagem interferem na qualidade da fermentação (McDonald &

¹Projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

²Aluna de Pós-graduação do Departamento de Nutrição e Produção Animal – FMVZ/USP. Bolsista FAPESP. E-mail: vjdamagalhaes@hotmail.com

³Professor do Departamento de Nutrição e Produção Animal – FMVZ/USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225 - CEP: 13630-000, Pirassununga-SP. E-mail: pmazza@usp.br

Henderson, 1962; Ely et al., 1981; Moon et al., 1981; Ely et al., 1982; Carr et al., 1984; Kung Jr. et al., 1984).

Embora apresente alto valor nutritivo, a alfafa possui características indesejáveis para o adequado processo de fermentação, como alta umidade no momento do corte, alto poder tampão, baixos teores de carboidratos solúveis e caule tubular e oco, que impede a completa retirada do ar no momento da ensilagem (McAllister et al., 1998).

Diversos procedimentos vêm sendo pesquisados visando contornar tais problemas, tal como o uso de inoculantes microbianos, os quais possuem a função de aumentar a população de bactérias lácticas no silo e, conseqüentemente, a produção de ácido láctico (Cleale et al., 1990), resultando em rápido declínio no pH, decréscimo nos níveis de acetato e butirato, bem como inibição da proteólise (Kung Jr. et al., 1984).

Considerando que, durante a abertura, a silagem é exposta à deterioração aeróbia, processo caracterizado por aumentos de temperatura, pH e oxidação dos produtos da fermentação, os inoculantes são alternativas para evitar perdas elevadas.

Objetivou-se, com este estudo, avaliar o efeito da adição do inoculante microbiano Silobac[®] sobre a composição bromatológica, o perfil de fermentação e a estabilidade aeróbia da silagem pré-seca de alfafa.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido nas dependências do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga.

A cultura de alfafa foi cortada em dezembro de 2000, quando em estágio do meio do florescimento. Após colhido e pré-seco por 4 horas, o material original foi acondicionado em 22 silos, com aproximadamente 150 cm de altura e 150 cm de diâmetro (capacidade de 600 quilos), revestidos com película de PVC branca. Os 22 silos foram divididos em dois tratamentos, com 11 silos controle e 11 silos aditivados com o inoculante comercial Silobac[®], segundo as recomendações do fabricante, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado. De acordo com essas recomendações, o produto fornece $1,0 \times 10^5$ unidades formadoras de colônia (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*), por grama de forragem.

Aproximadamente 600 kg de massa úmida foram colocados em cada silo, correspondendo a uma compactação de aproximadamente 230 kg de

silagem/m³. Os silos foram mantidos fechados por 40 dias expostos às intempéries.

Após abertura, foi retirada uma amostra de cada silo, que foi homogeneizada, sendo uma parcela separada para determinação de matéria seca (MS) e análise de proteína bruta (PB), segundo AOAC (1980), componentes da parede celular (fibra em detergente neutro - FDN, fibra em detergente ácido - FDA e lignina em detergente ácido - LDA), segundo metodologia descrita por Van Soest (1967), carboidratos solúveis (Johnson et al., 1966), amido (Pereira & Rossi Jr., 1995), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), segundo Van Soest & Robertson (1985), poder tampão (Tosi, 1973) e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), segundo Tilley & Terry (1963). A determinação do amido foi modificada, fazendo a prévia extração dos carboidratos solúveis por meio da metodologia preconizada por Hendrix (1993). Outra fração foi colocada em prensa manual, para extração dos sucos e imediata determinação do pH (medição em potenciômetro). Parte do suco foi fixada (1 mL de suco + 0,2 mL de ácido fórmico P.A.) e congelada, para posterior determinação dos ácidos orgânicos, por cromatografia gasosa (Erwin et al., 1961) e do nitrogênio amoniacal (N-NH₃), segundo Foldager (1977).

Para determinação da estabilidade aeróbia da silagem, aproximadamente 2,0 kg da amostra úmida foram retirados de cada silo, transferidos para caixas de isopor, com capacidade de 5 litros, e armazenados em uma sala com condições de temperatura controlada (25°C), a fim de permitir tomadas de temperatura ambiental e da silagem 0, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a abertura dos silos, por meio de um termômetro inserido 10 cm dentro da massa contida na caixa de isopor. A estabilidade aeróbia foi calculada como uma taxa de elevação de temperatura, usando o máximo da temperatura observada dividida pelo tempo necessário para alcançar a máxima temperatura (Ruppel et al., 1995). Adicionalmente, foram avaliados a máxima temperatura alcançada (em °C) e o tempo para a obtenção da máxima temperatura (em horas).

A avaliação da porcentagem de bolor das silagens foi realizada visualmente, por meio do escore de bolor, onde estipulou-se uma escala numérica de 0 a 100, que poderia variar em função da área da silagem embolorada, sendo 0 considerado uma silagem sem bolor aparente e 100 uma silagem com a superfície completamente embolorada. Os escores foram obti-

dos às profundidades de 10, 30 e 50 cm dentro dos fardos, à medida que a silagem era consumida.

Os resultados foram analisados utilizando-se o software computacional Statistical Analysis System (SAS, 1998). Os dados foram submetidos à análise de variância por intermédio do PROC GLM (General Linear Models). Exceto para as variáveis porcentagem de MS e escore de bolor, nas demais o modelo estatístico separou como causas de variação efeito de tratamento e a covariável porcentagem de MS na silagem. Para a variável escore de bolor foi adicionado o fator parcelas subdivididas, referentes às diversas profundidades de avaliação. Na presença de interação efeito de tratamento x efeito de profundidade, a separação de efeito de tratamento foi realizada dentro de cada profundidade. Foi utilizado o nível de significância de 5% para todos os testes realizados.

Resultados e Discussão

Os dados de composição bromatológica e digestibilidade *in vitro* da matéria seca das silagens submetidas ou não aos tratamentos encontram-se na Tabela 1.

A adição do inoculante à silagem diminuiu a MS total em 12,8% (6,6 unidades percentuais), em relação ao grupo controle. A hipótese de que a diminuição da MS esteja em função da adição de água para diluição e homogeneização do inoculante, dada que o grupo controle não recebeu adição de água, apresenta difícil sustentação, uma vez que, segundo as recomendações do fabricante, o produto deveria ser diluído em uma quantidade de água que deveria ser adicionada na proporção de 0,2 litros para cada 100 kg de matéria original. Este valor apresenta-se bastante diferente da mudança de 6,6 unidades percentuais observada entre os tratamentos.

Outra possibilidade para explicar os efeitos do inoculante sobre os teores de MS seria devido às modificações no processo fermentativo das forrageiras ensiladas, as quais poderiam reduzir o teor de MS, em função da produção da “água de metabolismo” (Zago, 1991). Mais uma vez, esta hipótese apresenta pouco respaldo científico, em virtude dos baixos níveis de carboidratos solúveis, presentes nesta forrageira, para a formação de água. É possível que a melhor explicação, para a diferença encontrada nos teores de MS entre as diferentes silagens, seja oriunda da metodologia experimental utilizada, na qual a confecção de uma silagem tratada

era seguida por uma silagem controle. Como forma de tentar contornar este problema, as demais variáveis analisadas foram corrigidas pela covariável porcentagem de MS.

Quando utilizaram bactérias ácido-láticas (*Streptococcus faecalis* e *Lactobacillus plantarum*) na inoculação da silagem de alfafa adicionada de

Tabela 1 - Composição bromatológica das silagens pré-secas de alfafa submetidas ou não à aplicação de inoculante¹

Table 1 - Chemical composition of control or inoculated alfalfa haylages

	Tratamentos ²		Média	CV	Prob.
	Controle	Inoculada			
	Control	Inoculated	Mean	CV	Prob.
MS	51,29 ^a	44,72 ^b	48,01	13,20	0,0111
DM					
PB	16,38	15,90	16,14	5,38	NS
CP					
NIDA	11,57	11,24	11,40	16,68	NS
ADIN					
NIDN	14,73	16,21	15,47	13,30	NS
NDIN					
FDN	46,65	47,10	46,88	8,38	NS
NDF					
FDA	39,76	40,16	39,96	10,87	NS
ADF					
LDA	11,13	10,44	10,78	12,28	NS
ADL					
Hemi	6,89	6,94	6,92	25,34	NS
Hemi					
Cel	28,63	29,72	29,18	11,59	NS
Cell					
Amido	0,69	0,82	0,76	45,73	NS
Starch					
CHOs	2,44	2,97	2,71	26,23	0,0645
WSC					
DIVMS	62,46	61,58	62,02	3,89	NS
IVDDM					

¹MS: matéria seca total (%); PB: proteína bruta (% MS); NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido (% do N total); NIDN: nitrogênio insolúvel em detergente neutro (% do N total); FDN: fibra em detergente neutro (% MS); FDA: fibra em detergente ácido (% MS); LDA: lignina em detergente ácido (% MS); Hemi: hemicelulose (% MS); Cel: celulose (% MS); Amido (% MS); CHOs: carboidratos solúveis (% MS); DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca (% MS); CV: coeficiente de variação (%); Prob.: probabilidade estatística; NS: não significativo.

²DM: dry matter (%); CP: crude protein (% DM); ADIN: acid detergent insoluble nitrogen (% of total N); NDIN: neutral detergent insoluble nitrogen (% of total N); NDF: neutral detergent fiber (% DM); ADF: acid detergent fiber (% DM); ADL: acid detergent lignin (% DM); Hemi: hemicellulose (% DM); Cell: cellulose (% DM); Starch (% DM); WSC: water-soluble carbohydrate (% DM); IVDDM: *in vitro* digestibility of the dry matter (% DM); CV: coefficient of variation (%); Prob: statistical probability; NS: not significant.

²Linhas com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente (5%).

² Rows with different letters differ statistically (5%).

5% de melaço, Singh et al. (1996) observaram a diminuição da MS.

Em alguns estudos não se detectou efeito do inoculante sobre o teor de MS em silagens de alfafa (Mader et al., 1985), seja com diferentes teores de umidade (Mir et al., 1995), seja utilizando cepas heterofermentativas (*Weissella paramesenteroides* e *Leuconostoc pseudomesenteroides*) ou homofermentativa (*Lactobacillus casei*), em silagens de alfafa ou gramínea (Cai et al., 1998), em silagens inoculadas com *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ou *Lactobacillus casei*, e armazenadas às temperaturas de 25 e 48°C (Cai et al., 1999b), em silagens de alfafa, sorgo ou gramínea com 40 dias de fermentação (Cai et al., 1999a), ou, ainda, estudando a adição de inoculantes comerciais (Sil-All[®], Silobac[®] e Pioneer 1174[®]), em silagens de girassol (Rodrigues et al., 2001).

Entretanto, Kung Jr. et al. (1991b), utilizando inoculante microbiano em silagem de alfafa pré-seca, observaram aumento na porcentagem de MS, após 60 dias de fermentação. Segundo Kung Jr. et al. (1984), quando o teor de MS diminui, a concentração de ácido láctico aumenta, resultando em rápida diminuição do pH, porém estes parâmetros não foram observados no presente estudo.

Nenhum efeito foi observado quanto aos teores de PB, NIDA e NIDN, evidenciando que o aquecimento foi limitado, em ambos os tratamentos. Estes dados concordam com os obtidos por Mader et al. (1985), Kung Jr. et al. (1991b) e Rodrigues et al. (2001), que observaram não haver efeito do inoculante sobre os teores de PB e NIDA. Porém, estão em desacordo com o estudo de Polan et al. (1998), os quais, trabalhando com silagem de alfafa vaporizada e adicionada de inoculante microbiano, ácido fórmico ou a combinação de ambos, observaram diminuição no teor de PB, no tratamento com inoculante, e diminuição no teor de NIDN, em todos os tratamentos, comparados ao grupo controle, não havendo efeito do inoculante ou da combinação sobre o teor de NIDA. Baixas concentrações de NIDA indicam pouca perda por calor, durante a fermentação da silagem (Mir et al., 1995), fato que não foi demonstrado, em função do inoculante, no presente experimento.

Nenhum efeito foi observado quanto aos teores de FDN, FDA, LDA, hemicelulose e celulose, o que talvez esteja associado à ausência de efeito sobre o pH, concordando com o estudo de Kung Jr. et al.

(1991b), os quais não encontraram efeito do inoculante sobre FDN e FDA, e de Rodrigues et al. (2001), não encontrando efeito, também, sobre a LDA. Entretanto, Polan et al. (1998), que também não observaram efeito do inoculante ou da combinação de inoculante e ácido fórmico sobre o teor de FDA, perceberam diminuição no teor de FDN em todos os tratamentos, comparado ao grupo controle. Neste caso, o mais baixo pH das silagens inoculadas promoveu hidrólise parcial da hemicelulose. Tais dados discordam dos obtidos por Harrison et al. (1989), que, utilizando silagens de gramínea e leguminosa, detectaram diminuição da FDA.

O amido também não sofreu efeito do inoculante, discordando dos achados de Rodrigues et al. (2001), os quais observaram que o inoculante Pioneer 1174[®] aumentou a concentração de amido, enquanto o Sil-All[®], que possui amilase, diminuiu, quando avaliaram a adição destes inoculantes em silagens de girassol. Entretanto, no presente experimento, as silagens tratadas com inoculante apresentaram tendência de aumento ($P=0,0645$) nos teores de carboidratos solúveis em 21,7% (0,53 unidades percentuais), devido possivelmente, à maior concentração de bactérias ácido-láticas, ao se adicionar o inoculante, que possivelmente melhoraram a eficiência de conversão dos carboidratos solúveis em ácido láctico, sem, contudo, aumentar a concentração final deste último. Este achado corrobora os resultados obtidos por Cai et al. (1999a) e Rodrigues et al. (2001), que observaram aumento nas concentrações dos carboidratos solúveis, e Polan et al. (1998), que encontraram aumento em todos os tratamentos, com inoculante microbiano, ácido fórmico ou a combinação destes, comparado ao grupo controle. Todavia, Kung Jr. et al. (1991b) não encontraram efeito do inoculante sobre esta variável.

A DIVMS também não sofreu efeito do inoculante, concordando com os estudos de Kung Jr. et al. (1991b) e Rodrigues et al. (2001), os quais concluíram não haver efeito do inoculante sobre a DIVMS, e discordando dos trabalhos de Ely et al. (1981), Mader et al. (1985) e Harrison et al. (1989), os quais observaram aumento da DIVMS, comparado ao grupo controle.

Os dados de avaliação do perfil fermentativo das silagens submetidas ou não ao tratamento com inoculante encontram-se na Tabela 2.

A adição do inoculante à silagem não alterou a concentração de ácido láctico ou a relação láctico:acético, podendo a ausência de efeito ser atri-

buída ao baixo teor de carboidratos solúveis existentes na alfafa, limitando a atividade potencial das bactérias adicionadas em melhorar a qualidade da silagem. Os dados encontrados neste estudo repetem os encontrados por Ely et al. (1981), Mader et al. (1985) e Polan et al. (1998), ao trabalharem com silagem de alfafa; Shockey et al. (1985), ao estudarem silagens de alfafa e milho; Shockey et al. (1988), ao avaliarem silagem de alfafa de baixa qualidade; e Rodrigues et al. (2001), ao inocularem silagem de girassol, os quais não observaram efeito do inoculante sobre as concentrações de ácido lático. De forma contrária, Kung Jr. et al. (1991b) observaram que o inoculante tendeu em aumentar o ácido lático e Cai et al. (1999a) observaram aumento nas concentrações deste ácido, comparado ao grupo controle, quando estudaram silagens de alfafa, sorgo ou gramínea com 40 dias, tratadas com inoculante microbiano. Em seus estudos, Bolsen et al. (1992) observaram que a combinação de inoculante e glicose aumentou a concentração de ácido lático na silagem de alfafa de segundo corte, mas este efeito não foi observado na de quarto corte ou quando utilizaram inoculante microbiano (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus cerevisiae*) ou glicose (2% MS), separadamente, nestas silagens, ou somente inoculante (*Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium*), na silagem de milho. Notaram também que não houve efeito do inoculante sobre outras características de fermentação da silagem de milho ou da silagem de alfafa de quarto corte. Entretanto, Cai et al. (1998) encontraram maior concentração de ácido lático nas silagens inoculadas com cepa homofermentativa, comparado às silagens inoculadas com cepas heterofermentativas e ao grupo controle. Cai et al. (1999b) observaram aumento na concentração de ácido lático em silagens na temperatura de 25°C, em relação ao grupo controle. Porém, na temperatura de 48°C, somente houve aumento para o tratamento com *Pediococcus acidilactici*, quando utilizaram silagens de alfafa e gramínea inoculadas com *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ou *Lactobacillus casei*.

No presente estudo, a inoculação da silagem aumentou a concentração de ácido acético em 162,9% (1,5 unidades percentuais) em relação ao grupo controle, mas não alterou as concentrações de etanol e dos ácidos propiônico e butírico. Provavelmente, este efeito sobre o ácido acético possa ser explicado pela presença de bactérias heterofermentativas no inoculante testado. Tais dados discordam dos obtidos

por Shockey et al. (1988), os quais não observaram efeito do inoculante sobre as concentrações de ácido acético, e dos obtidos por Mader et al. (1985), que também não observaram efeito sobre a concentração deste ácido, embora tivessem notado diminuição nas concentrações dos ácidos propiônico e butírico, comparado ao grupo controle. Entretanto, Bolsen et al. (1992) perceberam que a combinação de inoculante e glicose diminuiu a concentração de ácido acético, na silagem de alfafa de segundo corte, mas não houve efeito para os tratamentos com inoculante ou glicose separadamente. O inoculante e a combinação diminuíram a concentração de etanol, na silagem de alfafa de segundo corte, porém, sem efeito para o tratamento com glicose, em relação ao grupo controle.

Também não houve efeito dos tratamentos sobre as concentrações dos ácidos propiônico e butírico,

Tabela 2 - Fermentação das silagens pré-secas de alfafa submetidas ou não à aplicação de inoculante¹

Table 2 - Fermentation pattern of control or inoculated alfalfa haylages

	Tratamentos ²		Média	CV	Prob.
	Controle	Inoculada			
	Control	Inoculated	Mean	CV	Prob.
Etanol	0,024	0,018	0,021	71,50	NS
Ethanol					
Acético	0,894 ^b	2,351 ^a	1,623	96,73	0,0479
Acetic					
Prop.	0,000	0,000	0,000	0,000	NS
Prop.					
Butírico	0,000	0,000	0,000	0,000	NS
Butyric					
Lático	4,448	5,620	5,034	32,04	NS
Lactic					
Rel Lat: Ace	4,868	4,574	4,721	48,11	NS
Lac: Ace ratio					
N-NH ₃	5,21	8,19	6,70	226,32	NS
NH ₃ -N					
pH	5,33	4,96	5,14	8,87	NS
PT	51,73	52,90	52,32	12,09	NS
BC					

¹ Etanol (% MS); Acético (% MS); Prop.: propiônico (% MS); Butírico (% MS); Lático (% MS); Rel Lat: Ace: relação lático:acético; N-NH₃: nitrogênio amoniacal (% do N total); PT: poder tampão (meq./100g MS de forragem); CV: coeficiente de variação (%); Prob.: probabilidade estatística; NS: não significativo.

² Ethanol (% DM); Acetic (% DM); Prop.: propionic (% DM); Butyric (% DM); Lactic (% DM); Lac: Ace ratio: lactic:acetic ratio; NH₃-N: ammoniacal nitrogen (% of total N); BC: buffering capacity (meq./100 g of DM); CV: coefficient of variation (%); Prob: statistical probability; NS: not significant.

² Linhas com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente (5%).

² Rows with different letters differ statistically (5%).

quando Rodrigues et al. (2001) estudaram a inoculação da silagem de girassol. Contudo, esses autores observaram aumento na concentração de etanol e diminuição na de ácido acético. Na inoculação das silagens de alfafa ou gramínea com cepas heterofermentativas, e no grupo controle, Cai et al. (1998) obtiveram maior concentração de ácido butírico, comparando com silagem inoculada com cepa homofermentativa, ocorrendo o mesmo com o ácido acético na silagem de alfafa, mas sem efeito para a silagem de gramínea. Cai et al. (1999b) notaram diminuição na concentração do ácido butírico, em silagens na temperatura de 25°C, em relação ao grupo controle; na temperatura de 48°C, somente houve diminuição para o tratamento com *P. acidilactici* e não houve efeito dos inoculantes sobre as concentrações dos ácidos acético e propiônico.

Kung Jr. et al. (1991b) observaram que o inoculante diminuiu a concentração de ácido acético, o que foi percebido também por Cai et al. (1999a), que observaram, ainda, diminuição nas concentrações dos ácidos butírico e propiônico, comparado ao grupo controle. Polan et al. (1998) não observaram efeito do inoculante sobre a concentração de ácido butírico.

No presente trabalho, a concentração de N-NH₃ não foi alterada com a adição do inoculante, estando de acordo com Bolsen et al. (1992) e Polan et al. (1998), mas discordando de Kung Jr. et al. (1991b), Shockey et al. (1988), Cai et al. (1999a) e Rodrigues et al. (2001), os quais observaram diminuição nas concentrações do N-NH₃. Cai et al. (1999b) observaram diminuição do nitrogênio amoniacal nas silagens tratadas, em relação ao grupo controle, na temperatura de 25°C; na temperatura de 48°C, somente houve diminuição para o tratamento com *P. acidilactici*. Tal registro foi confirmado também com o trabalho de Cai et al. (1998), que, na inoculação das silagens com cepas heterofermentativas e no grupo controle, obtiveram maior concentração de N-NH₃, comparando com silagem inoculada com cepa homofermentativa.

A adição do inoculante na silagem não teve efeito sobre o pH, corroborando os resultados obtidos por Polan et al. (1998), Shockey et al. (1988) e Cai et al. (1999b). Entretanto, Kirov (1962), McDonald et al. (1965), Ely et al. (1981), Mader et al. (1985), Kung Jr. et al. (1991b), Cai et al. (1999a) e Rodrigues et al. (2001) observaram diminuição do pH, comparado ao grupo controle. Nos estudos de Bolsen et al. (1992), a combinação de inoculante e glicose diminuiu o pH da silagem de alfafa de segundo corte, mas não houve

efeito para os tratamentos com inoculante ou glicose separadamente, em relação ao grupo controle. Na inoculação da silagem com cepa homofermentativa, ocorreu pH mais baixo, comparado às silagens inoculadas com cepas heterofermentativas e ao grupo controle (Cai et al., 1998). Singh et al. (1996), ao estudarem a combinação de inoculante e melaço (5%) na silagem de alfafa, também observaram diminuição do pH.

Jones et al. (1992) relataram que a redução do pH, causada pelo inoculante, dobrou com a adição de açúcar, em silagem de alfafa com 70% de umidade, mas com 50% a adição de açúcar não alterou o desempenho do inoculante. Estes resultados sugerem que os teores de umidade e açúcar da silagem de alfafa podem limitar a eficiência dos inoculantes.

Associado à ausência de efeito do inoculante sobre a produção dos ácidos orgânicos da silagem, também não se observou efeito sobre o poder tampão, discordando de Rodrigues et al. (2001), os quais encontraram aumento do poder tampão, quando utilizaram o inoculante Pioneer 1174[®], em silagem de girassol.

É possível que a adequada fermentação obtida na silagem controle estudada nesta pesquisa e demonstrada pelos teores dos ácidos láctico e butírico e da relação láctico:acético, adivindas provavelmente do processo de pré-secagem, tenha inibido os ganhos que poderiam ocorrer com a inoculação.

Os dados de estabilidade aeróbia das silagens, submetidas ou não ao tratamento com inoculante, encontram-se na Tabela 3.

O inoculante não provocou efeito sobre o tempo para alcançar a máxima temperatura, sobre a temperatura máxima alcançada ou sobre a taxa de elevação da temperatura, concordando com os estudos de Cai et al. (1999a) e Rodrigues et al. (2001), que também não encontraram efeito do inoculante sobre a estabilidade aeróbia. Kung Jr. et al. (1991a) também não observaram alteração da estabilidade aeróbia, comparada ao grupo controle, quando aplicaram a combinação de inoculante e antibiótico. Em outros estudos (Merry & Braithwaite, 1987; Pitt, 1990; Polan et al., 1998), a adição de bactérias ácido-láticas diminuiu a estabilidade aeróbia da silagem.

Segundo Woolford (1984), a elevação da tensão osmótica dificulta o desenvolvimento de microorganismos indesejáveis. Assim, a estabilidade fermentativa é obtida com pH mais elevado (Haigh, 1990).

A deterioração aeróbia de silagens inoculadas está associada com altas concentrações de

carboidratos solúveis residuais e de ácido láctico, bem como à ausência de ácidos graxos voláteis (Kung Jr. et al., 1991b). A maioria das cepas de leveduras isoladas de silagens deterioradas possui alta tolerância ao ácido láctico, mas baixa tolerância ao ácido butírico. Estas leveduras são capazes de crescer em condições de pH baixo e de utilizar ácido láctico e carboidratos solúveis para o seu crescimento, mas são inibidas por baixas concentrações de ácido butírico e propiônico (Hogan et al., 1990). Portanto, relativamente, altas concentrações de ácidos butírico, propiônico e acético na silagem podem causar melhor estabilidade aeróbia.

De acordo com Muck & Kung Jr. (1997), o aumento nas concentrações de ácido acético, juntamente com a redução de fungos e leveduras, no início da fermentação da silagem, contribuiu para melhor estabilidade aeróbia após a abertura do silo.

Embora tenham aumentado as concentrações de ácido acético no presente estudo, os inoculantes não melhoram a estabilidade aeróbia, provavelmente por esta já se encontrar adequada.

Os dados de escore de bolor, das silagens submetidas ou não ao tratamento com inoculante, encontram-se na Tabela 4.

Observou-se tendência de efeito de interação ($P=0,0594$) entre tratamento e profundidade de avaliação. Ao se avaliar efeito de tratamento em cada profundidade, observou-se que as silagens inoculadas apresentaram tendência de diminuição do escore de bolor em 45,5% (20,9 unidades percentuais) na profundidade de 10 cm, em relação ao grupo controle, embora o inoculante não tivesse causado efeito nas profundidades de 30 e 50 cm (Figura 1). Kung et al. (1991b) também observaram que o inoculante tendeu a diminuir a porcentagem de bolor, comparado ao grupo controle, enquanto Bolsen et al. (1992), estudando silagens de alfafa de segundo e quarto cortes, tratadas com inoculante (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus cerevisiae*), glicose (2% MS) ou a combinação de ambos, não notaram efeito do inoculante sobre as mesmas. Na silagem de milho tratada somente com inoculante (*Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium*), esses autores também não perceberam efeito. Polan et al. (1998), trabalhando com silagem de alfafa vaporizada e adicionada de inoculante microbiano, ácido fórmico ou a combinação de ambos, notificaram que a combinação diminuiu o emboloramento das silagens, comparado à adição separada do ácido fórmico ou inoculante.

Na profundidade de 10 cm, o material encontra-se mais exposto à penetração de oxigênio, permitindo o maior desenvolvimento de bolores. É possível que a maior concentração de ácido acético, encontrada na silagem inoculada, tenha inibido o crescimento de bolor nessa profundidade, mas não a 30 ou 50 cm, onde o escore de bolor já foi naturalmente mais baixo.

Tabela 3 - Estabilidade aeróbia das silagens pré-secas de alfafa submetidas ou não à aplicação de inoculante¹

Table 3 - Aerobic stability of control or inoculated alfalfa haylages

	Tratamentos ²		Média	CV	Prob.
	Controle	Inoculada			
	Control	Inoculated	Mean	CV	Prob.
Tempo (h)	61,09	58,91	60,00	50,52	NS
Period (h)					
Máx. (°C)	24,30	23,78	24,04	3,02	NS
Max. (°C)					
Taxa (°C/h)	0,023	0,023	0,023	124,96	NS
Rate (°C/h)					

¹Tempo: tempo decorrido para alcançar a máxima temperatura (horas); Máx.: máxima temperatura alcançada (°C); Taxa: taxa de elevação da temperatura (°C/hora); CV: coeficiente de variação (%); Prob.: probabilidade estatística; NS: não significativo.

²Period: period of time to reach maximum temperature (hours); Max.: maximum temperature (°C); Rate: rate of increasing temperature (°C/hour); CV: coefficient of variation (%); Prob: statistical probability; NS: not significant.

Tabela 4 - Escore de bolor das silagens pré-secas de alfafa submetidas ou não à aplicação de inoculante¹

Table 4 - Mould score of control or inoculated alfalfa haylages

Profundidade	Tratamentos		Média	CV	Prob.
	Controle	Inoculada			
Depth	Control	Inoculated	Mean	CV	Prob.
10	45,91	25,00	35,45	87,03	0,0750
10					
30	11,36	9,09	10,23	111,36	NS
30					
50	7,27	6,36	6,82	170,18	NS
50					
Média	21,52	13,48	17,50	135,06	NS
Mean					

¹Profundidade: 10, 30 e 50 cm, onde se avaliou a porcentagem de área embolorada presente na silagem; CV: coeficiente de variação (%); Prob.: probabilidade estatística; NS: não significativo.

²Depth: 10, 30 and 50 cm, where the percentage of mouldy area on silage was evaluated; CV: coefficient of variation (%); Prob: statistical probability; NS: not significant.

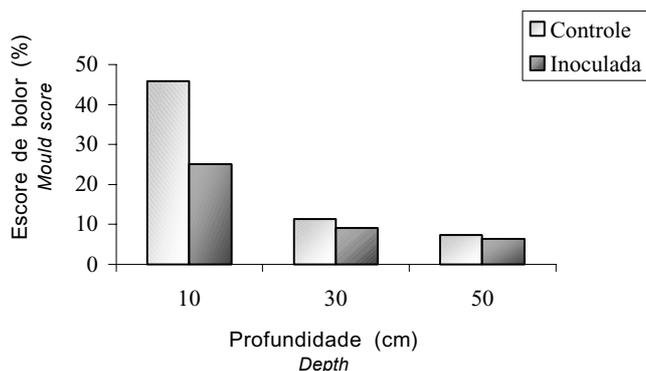


Figura 1 - Escore de bolor das silagens pré-secadas de alfafa controle e inoculada, nas profundidades de 10, 30 e 50 cm.

Figure 1 - Mould score of inoculated and control alfalfa haylages of 10, 30 and 50 cm.

Conclusões

Não é possível recomendar a utilização do produto Silobac[®] na inoculação da silagem pré-seca de alfafa, uma vez que nenhum efeito benéfico foi observado sobre a composição bromatológica, o perfil fermentativo ou a estabilidade aeróbia das silagens. Entretanto, pequena melhora no aspecto visual externo da silagem pôde ser notada pelos produtores.

A escassez de trabalhos nacionais nesta área evidencia a necessidade de mais pesquisas.

Agradecimento

Aos funcionários Everson Lázaro e Gilmar Botteon, pela ajuda com a coleta de amostras, e aos técnicos Ari de Castro, Gilson de Godoy e Simi Robassini, pela ajuda com as análises laboratoriais.

Literatura Citada

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 10.ed. Washington, D.C.: Association of Analytical Chemistry. 1980. 1015p.
- BOLSEN, K.K.; LIN, C.; BRENT, B.E. et al. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.11, p.3066-3083, 1992.
- CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M. et al. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.3, p.520-526, 1999a.
- CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M. et al. Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and of *Weissella* and

Leuconostoc spp. from forage crops on silage fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, n.8, p.2982-2987, 1998.

- CAI, Y.; KUMAI, S.; OGAWA, M. et al. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, n.7, p.2901-2906, 1999b.
- CARR, S.B.; HAMMES JR., R.C.; MOE, A.J. et al. Corn silage preservation with anhydrous ammonia, live culture microbial, or organic acid-based additives. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.7, p.1474-1481, 1984.
- CLEALE, R.M.; FIRKINS, J.L.; Van Der BEEK, F. et al. Effect of inoculation of whole plant corn forage with *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus xylosus* on preservation of silage and heifer growth. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.3, p.711-718, 1990.
- ELY, L.O.; MOON, N.J.; SUDWEEKS, E.M. Chemical evaluation of *Lactobacillus* addition to alfalfa, corn, sorghum, and wheat forage at ensiling. **Journal of Dairy Science**, v.65, n.6, p.1041-1046, 1982.
- ELY, L.O.; SUDWEEKS, E.M.; MOON, N.J. Inoculation with *Lactobacillus plantarum* of alfalfa, corn, sorghum, and wheat silages. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.12, p.2378-2387, 1981.
- ERWIN, E.S.; MACCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.
- FOLDAGER, J. **Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation**. 1977. 167p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Michigan State University, East Lansing, 1977.
- HAI GH, P.M. Effect of herbage water-soluble carbohydrate content and weather conditions at ensilage on the fermentation of grass silages made on commercial farms. **Grass and Forage Science**, v.45, n.3, p.263-271, 1990.
- HARRISON, J.H.; SODERLUND, S.D.; LONEY, K.A. Effect of inoculation rate of selected strains of lactic acid bacteria on fermentation and in vitro digestibility of grass-legume forage. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.9, p.2421-2426, 1989.
- HENDRIX, D.L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science**, v.33, n.6, p.1306-1311, 1993.
- HOGAN, C.M.; MES HARTREE, M.; SADDLER, J.N. et al. Assessment of methods to determine minimal cellulase concentrations for efficient hydrolysis of cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, n.5, p.614-620, 1990.
- JOHNSON, R.R.; BALWANI, T.L.; JOHNSON, L.J. et al. Corn plant maturity. II. Effect on *in vitro* cellulose digestibility and soluble carbohydrate content. **Journal of Animal Science**, v.25, n.3, p.617-623, 1966.
- JONES, B.A.; SATTER, L.D.; MUCK, R.E. Influence of bacterial inoculant and substrate addition to lucerne ensiled at different dry matter contents. **Grass and Forage Science**, v.47, n.1, p.19-27, 1992.
- KIROV, N. A study of the effects of bacterial ferments on quality of silages made from forage easy and difficult to ensile. **Nauch Tr Vishh Selskostop**, v.1, n.1, p.363-367, 1962.
- KUNG JR., L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W. et al. Added ammonia or microbial inocula for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various

- percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.2, p.299-306, 1984.
- KUNG JR., L.; TUNG, R.S.; MACIOROWSKI, K.G. Effect of a microbial inoculant (Ecosyl TM) and/or a glycopeptide antibiotic (vancomycin) on fermentation and aerobic stability of wilted alfalfa silage. **Animal Feed Science and Technology**, v.35, n.1, p.37-48, 1991a.
- KUNG JR., L.; TUNG, R.S.; MACIOROWSKI, K.G. et al. Effects of plant cell-wall-degrading enzymes and lactic acid bacteria on silage fermentation and composition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.12, p.4284-4296, 1991b.
- LINDGREN, S.; KASPERSSON, A.; RYDBERG, E. et al. Effect of inoculants, grain, and formic acid on silage fermentation. **Swedish Journal of Agricultural Research**, v.13, n.2, p.91-100, 1983.
- MADER, T.L.; BRITTON, R.A.; KRAUSE, V.E. et al. Effect of additive on alfalfa silage fermentation characteristics and feedlot performance of steers. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.7, p.1744-1747, 1985.
- McALLISTER, T.A.; FENIUK, R.; MIR, Z. et al. Inoculants for alfalfa silage: effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. **Livestock Production Science**, v.53, n.2, p.171-181, 1998.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A.R. Buffering capacity of herbage samples as a factor in ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.13, n.3, p.395-400, 1962.
- McDONALD, P.; STIRLING, A.C.; HENDERSON, A.R. et al. Fermentation studies on red clover. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.16, n.5, p.549-557, 1965.
- MERRY, R.J.; BRAITHWAITE, G.D. The effect of enzymes and inoculants on the chemical and microbiological composition of grass legume silages. In: SILAGE CONFERENCE, 8., 1987, Hurlley. **Proceedings...** Hurlley: Institute for Grassland and Animal Production, 1987. p.27.
- MIR, Z.; JAN, E.Z.; ROBERTSON, J.A. et al. Effects of microbial inoculant and moisture content on preservation and quality of round baled alfalfa. **Canadian Journal of Animal Science**, v.75, n.1, p.15-23, 1995.
- MOON, N.J.; ELY, L.O.; SUDWEEKS, E.M. Fermentation of wheat, corn, and alfalfa silages inoculated with *Lactobacillus acidophilus* and *Candida sp.* at ensiling. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.5, p.807-813, 1981.
- MUCK, R.E. Initial bacterial numbers on lucerne prior to ensiling. **Grass and Forage Science**, v.44, n.1, p.19-25, 1989.
- MUCK, R.E.; KUNG JR., L. Effects of silage additives on ensiling. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK NORTH AMERICA CONFERENCE, 1997, Hershey. **Proceedings...** Hershey: NRAES, 1997. p.187-199.
- MULLER, T.; FEHRMANN, E.; SEYFARTH, W. et al. Quality of grass silage depending on epiphytic lactic acid bacteria. In: FORAGE CONSERVATION TOWARDS 2000, 123., 1991, Braunschweig. **Proceedings...** Braunschweig: Landbauforschung Voelkenrode Sonderheft, 1991. p.297.
- PEREIRA, J.R.A.; ROSSI JR., P. **Manual prático de avaliação nutricional de alimentos**. 1.ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1995. 25p.
- PITT, R.E. A model of cellulase and amylase additives in silage. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.7, p.1788-1799, 1990.
- POLAN, C.E.; STIEVE, D.E.; GARRETT, J.L. Protein preservation and ruminal degradation of ensiled forage treated with heat, formic acid, ammonia, or microbial inoculant. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.3, p.765-776, 1998.
- RODRIGUES, P.H.M.; ALMEIDA, T.F.; MELOTTI, L. et al. Efeitos da adição de inoculantes microbianos sobre a composição bromatológica e sobre a fermentação da silagem de girassol produzida em silos experimentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p.2169-2175, 2001. (Suplemento)
- RUPPEL, K.A.; PITT, R.E.; CHASE, L.E. et al. Bunker silo management and its relationship to forage preservation on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.1, p.141-153, 1995.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **SAS user's guide: statistics**. 7.ed. Cary: 1998.
- SHOCKEY, W.L.; DEHORITY, B.A.; CONRAD, H.R. Effects of microbial inoculant on fermentation of alfalfa and corn. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.11, p.3076-3080, 1985.
- SHOCKEY, W.L.; DEHORITY, B.A.; CONRAD, H.R. Effects of microbial inoculant on fermentation of poor quality alfalfa. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.3, p.722-726, 1988.
- SINGH, A.; EDWARD, J. C.; MOR, S. et al. Biochemical changes during ensiling of wilted lucerne with inoculation of lactic acid bacteria and molasses. **Indian Journal of Animal Nutrition**, v.13, n.2, p.77-82, 1996.
- SPECKMAN, C.A.; PHILIPS, R.M.; LINNERTZ, D.P. et al. A survey for indigenous *Lactobacillus* species on standing field corn at ensiling maturity. **Journal of Animal Science**, v.53, p.99, 1981. (Supplement 1)
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, v.18, n.2, p.104-111, 1963.
- TOSI, H. Conservação de forragem como consequência do manejo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 1., 1973, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1973. p.117-140.
- Van SOEST, P.J. Development of a comprehensive system for analysis and its application to forage. **Journal of Dairy Science**, v.26, n.1, p.119-128, 1967.
- Van SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. **Analysis of forages and fibrous foods**. 1.ed. Ithaca: Cornell University, 1985. 202p.
- WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. 350p.
- ZAGO, C.P. Cultura de sorgo para a produção de silagem de alto valor nutritivo. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 4., 1991, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1991. p.169-213.

Recebido em: 10/10/02

Aceito em: 01/07/03