



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA



ANA CAROLINA SOARES REAME

**Valor Nutricional e Qualidade Microbiológica de Silagem de Girassol
Inoculada com *Lactobacillus buchneri* e *Bacillus subtilis*.**

DOURADOS – MS

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

**Valor Nutricional e Qualidade Microbiológica de Silagem de Girassol
Inoculada com *Lactobacillus buchneri* e *Bacillus subtilis*.**

ANA CAROLINA SOARES REAME

Orientador: Prof Dr. Jefferson Rodrigues Gandra

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências para obtenção de grau de Bacharel em Zootecnia.

DOURADOS – MS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R288v Reame, Ana Carolina Soares

Valor Nutricional e Qualidade Microbiológica de Silagem de Girassol
Inoculada com *Lactobacillus buchneri* e *Bacillus subtilis*. / Ana Carolina Soares
Reame -- Dourados: UFGD, 2017.

45f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Jefferson Rodrigues Gandra

TCC (Graduação em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias,
Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. inoculantes. 2. *Helianthus annuus* L.. 3. nutrição animal. 4. bacterias. 5.
ensilagem. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

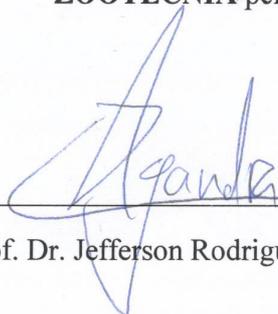
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: VALOR NUTRICIONAL E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE
SILAGEM DE GIRASSOL INOCULADA COM *Lactobacillus buchneri* E *Bacillus*
subtilis

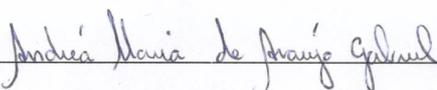
AUTOR: Ana Carolina Soares Reame

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra

Aprovado como parte das exigências para a obtenção do grau de bacharel em
ZOOTECNIA pela comissão examinadora.



Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra - Orientador

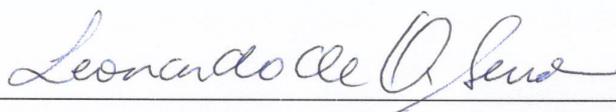


Prof. Dra. Andrea Maria de Araújo Gabriel



Dra. Erika Rosendo de Sena Gandra

Data de realização: 29/03/2017



Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Seno

Presidente da comissão do TCC-Zootecnia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, que me abençoou em todas as etapas da minha vida, e esteve presente principalmente no período da faculdade me dando suporte emocional para me adaptar a outra cidade.

Aos meus pais e meu irmão, por me apoiarem em cada decisão difícil que eu tive que tomar ao longo da graduação, e que nunca deixaram eu passar por nenhuma dificuldade, me amando da melhor forma.

As minhas avós Dirce e Jandyra, que me apoiaram e me ajudaram nesses anos com muito amor, paciência e dedicação.

A Universidade Federal da Grande Dourados, e todo o corpo docente, que meu deu suporte para que o experimento fosse realizado, e me proporcionou todo o aprendizado até aqui.

Ao meu orientador Prof^o. Dr^o. Jefferson Rodrigues Gandra, que me proporcionou realizar esse experimento e me ajudou com toda a paciência e dedicação possível. Sempre esteve ao meu lado na minha formação acadêmica, e me ensinou muito.

Agradeço a todos os professores pelos ensinamentos ao longo dos anos, em especial a professora Ana Carolina Amorim Orrico, Andrea Maria de Araujo Gabriel, Leonardo de Oliveira Seno, que mais me apoiaram durante a graduação, não me deixando desistir.

Aos meus amigos e companheiros de faculdades que estiveram sempre ao eu lado quando precisei e me apoiaram, em especial a Maria Gabriela Lobo e Cecília, Elenir Martini, Murilo Vendramini, Thiago Brites, com quem eu sempre pude contar.

Valor nutricional e qualidade microbiológica de silagem de girassol inoculada com *Lactobacillus buchneri* e *Bacillus subtilis*

RESUMO: Objetivou – se avaliar o valor nutricional e qualidade microbiológica da silagem de girassol inoculada com bactérias *Lactobacillus buchneri* e *Bacillus subtilis*. O experimento foi conduzido nas dependências do setor de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados – FCA/UFGD, no período de maio a setembro de 2013. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado composto por três tratamentos, com 20 silos por tratamento, sendo eles: tratamento controle (CON), sem inoculante; tratamento LB, adição de *Lactobacillus buchneri* de 2.6×10^{10} ufc/g; e tratamento LBBS, adição de *Lactobacillus buchneri* de 2.6×10^{10} ufc/g + *Bacillus subtilis* 1×10^9 ufc/g. Antes da ensilagem, amostras (1000 gramas) de forragem fresca foram armazenadas a -20°C para análises químicas aos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro e ácido, lignina e cinzas, conforme técnicas descritas por AOAC (2002). O teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia líquida de lactação foram calculados segundo o NRC (2001). Após a compactação da forragem, os silos foram vedados com fita adesiva, pesados e armazenados. Aos 15, 30, 45 e 60 dias de fermentação, foram novamente pesados e retirada amostras de cada tratamento para análises, em seguida, abertos os últimos silos aos 60 dias. Os tratamentos não afetaram o pH e a concentração de nitrogênio amoniacal da silagem de girassol. Os inoculantes diminuíram o teor de MS da silagem de girassol. Os inoculantes mostraram efeitos positivos sobre a digestibilidade *in vitro* de nutrientes, nos quais aumentaram as digestibilidades de MS, MO e FDN em comparação com CON. Embora os tratamentos não tenham afetado as bactérias totais e as bactérias anaeróbias, as silagens tratadas com LB ou LB + BS apresentaram menores concentrações de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e maiores quantidades de bactérias lácticas quando comparadas com CON. A adição de inoculantes microbianos influenciou de maneira positivamente o valor nutricional e a qualidade microbiológica da silagem de girassol.

PALAVRAS – CHAVE: inoculantes; *Helianthus annuus L.*; nutrição animal; bactérias; ensilagem.

Nutritional value and microbiological quality of sunflower silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* and *Bacillus subtilis*

ABSTRACT: The objective was to evaluate the nutritional value and microbiological quality of sunflower silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* and *Bacillus subtilis* bacteria. The experiment was conducted at the Animal Science Department of the Faculty of Agricultural Sciences of the Federal University of Grande Dourados - FCA / UFGD, from May to September 2013. The experimental design was a completely randomized design consisting of three treatments, with 20 Silos by treatment, being: control treatment (CON), without inoculant; LB treatment, addition of *Lactobacillus buchneri* 2.6×10^{10} cfu / g; And LBBS treatment, addition of *Lactobacillus buchneri* 2.6×10^{10} cfu / g + *Bacillus subtilis* 1×10^9 cfu / g. Before ensiling, samples (1000 grams) were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for chemical analysis of dry matter (DM), organic matter, crude protein, ethereal extract, neutral and acid detergent fiber, lignin and ash, according to the techniques described By (AOAC 2002). The NDT and energy content of lactation were calculated according to (NRC, 2001). After compaction of the forage, the silos were sealed with adhesive tape, weighed and stored. At 15, 30, 45 and 60 days of fermentation, weighed and sampled from each treatment for analysis, then the last silos were opened at 60 days. The treatments did not affect the pH and ammoniacal nitrogen concentration of sunflower silage. The inoculants decreased the DM content of sunflower silage. The inoculants showed positive effects on the in vitro digestibility of nutrients, in which the digestibilities of DM, OM and NDF increased in comparison to NOC. Although the treatments did not affect the total bacteria and the anaerobic bacteria, the silages treated with LB or LB + BS presented lower concentrations of aerobic bacteria, molds and yeasts and higher amounts of lactic acid bacteria when compared to NOC. The addition of microbial inoculants positively influenced the nutritional value and microbiological quality of sunflower silage.

KEY WORDS: inoculants; *Helianthus annuus L.*; animal nutrition; bacteria; silage.

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 GIRASSOL COMO SILAGEM.....	12
2.2 INOCULANTE MICROBIANO.....	15
2.2.1 <i>Lactobacillus buchneri</i>	16
2.2.2 <i>Bacillus subtilis</i>	17
2.3 VALOR NUTRICIONAL DA FORRAGEM DE GIRASSOL	17
2.4 PERFIL MICROBIOLÓGICO (POPULAÇÃO MICROBIANA).....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 VALOR NUTRICIONAL	24
3.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	25
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	27
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	27
4.2 MICROBIOLOGIA.....	32
5 CONCLUSÃO	35
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Composição química do girassol planta inteira antes do momento a ensilagem (%).....	24
Tabela 02. Valor bioquímico e nutricional de acordo com os tratamentos experimentais	26
Tabela 03. Microbiologia de acordo com os tratamentos experimentais.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Quantidade de MS na digestibilidade in vitro de acordo com os tratamentos experimentais em diferentes dias de abertura.....	28
Figura 02- Quantidade de FDN na digestibilidade in vitro de acordo com os tratamentos experimentais em diferentes dias de abertura.....	29
Figura 03. Percentagem de matéria seca (MS) de acordo com os tratamentos experimentais em diferentes dias de abertura.....	30
Figura 04. Percentagem de proteína bruta de acordo com os tratamentos experimentais em diferentes dias de abertura.....	30
Figura 05. Percentagem de FDN de acordo com os tratamentos experimentais em diferentes dias de abertura.....	31

1. INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma cultura de importância reconhecida e que pode ser cultivado em diversas regiões. É uma ótima alternativa para silagem, pois se desenvolve bem em climas temperados, subtropical e tropical e, também, possui maior tolerância à deficiência hídrica e geadas leves, apresentando como vantagens o alto valor energético e o teor de proteína (GONÇALVES & TOMICH, 1999). Quando a ensilagem é conduzida de forma adequada, o girassol produz silagens com fermentação apropriada à conservação da forragem estocada, geralmente, a silagem de girassol contém alto teor proteico e, devido ao elevado teor de óleo, também possui alto valor energético, contudo, a fração fibrosa geralmente apresenta maior proporção de lignina e menor digestibilidade, quando comparada às silagens de milho e de sorgo (TOMICH *et al.*, 2004^a).

Os efeitos do uso de aditivos, seja sobre a fermentação, composição da silagem ou desempenho animal, estão condicionados ao tipo de inoculante e sua atividade biológica, à quantidade aplicada e ao tipo de forragem, em teor de matéria seca e composição química (HARRISON *et al.*, 1994). Inoculantes microbianos usados como aditivos incluem bactérias homofermentativas, heterofermentativas, ou a combinação destas. Inoculantes com base em bactérias homofermentativas caracterizam-se pela taxa de fermentação mais rápida, menor proteólise, promovem aumento na produção de ácido lático, menores teores de ácidos acéticos e butíricos, menor teor de etanol, maior recuperação de energia e matéria seca e rápida redução do pH da massa ensilada (ZOPOLLATTO *et al.*, 2009; KUNG *et al.*, 2003). Já as bactérias heterofermentativas metabolizam o ácido lático e a glicose presentes durante a fermentação para síntese de ácido propiônico e ácido acético, eficazes no controle de fungos e demais microrganismos deterioradores, sob baixo pH (OUDE ELFERERINK *et al.*, 2001).

A bactéria *Lactobacillus buchneri* (*L. buchneri*), originada do isolamento natural em silagens aerobicamente estáveis, produz durante a fermentação os ácidos lático, acético e 1,2-propanodiol, cujo acetato produzido tem função inibidora sobre espécies de microrganismos deterioradores (leveduras e fungos) que crescem quando a silagem é exposta ao ambiente (DRIEHUIS *et al.*, 1999; OUDE ELFERERINK *et al.*, 2001). Essas bactérias heterofermentativas são uma opção como aditivo, principalmente por promoverem maior estabilidade aeróbica, além de produzirem ácido acético e lático, não produzem etanol graças à ausência da enzima acetaldeído desidrogenase (QUEIROZ, 2006). Ela também é responsável

pela produção de bacteriocinas, que possuem efeitos antimicrobianos, sendo capaz de produzir a buchnerina que tem potencial de ser utilizada no controle de bactérias gram-positivas, as quais estão, geralmente, associadas à deterioração de alimentos (YILDIRIM, 2001).

Bacillus subtilis (*B. subtilis*) é uma rizobactéria gram-positiva, esporulante, produtora de diversos metabólitos secundários (STEIN, 2005). As cepas do gênero *B. subtilis* também utilizados como aditivos no processo de ensilagem, porém, com o propósito de diminuir a deterioração aeróbica por produzirem substâncias com ação antimicrobianas, inclusive antibióticos, que possibilitam o controle biológico de fitopatógenos (LANNA FILHO *et al.*, 2010; BASSO *et al.*, 2012). Além do controle de fungos e leveduras o *B. subtilis* pode aumentar o valor nutritivo das silagens, pois as bacteriocinas, que podem ter ação antibiótica, quando o animal ingere a silagem inoculada com esse *Bacillus*, portanto, estas bacteriocinas são proteínas bacterianas com ação antagonista sobre as outras bactérias (BARBOSA & TORRES, 2005). *B. subtilis* pode apresentar também efeito probiótico, que conceitualmente, inclui a ação de microrganismos como promotores de crescimento (LILLY & STILLWELL, 1965).

O valor nutricional da silagem depende muito do cultivar utilizado, do estágio de maturação no corte e da origem do processo fermentativo, o que interfere diretamente no desempenho animal. As silagens de girassol geralmente apresentem menor conteúdo de fibra em detergente neutro (FDN) que as silagens tradicionais, a silagem de girassol contém alta proporção de fibra em detergente ácido (FDA) e de lignina, o que é capaz de restringir a digestibilidade de sua fração fibrosa e, conseqüentemente, o aproveitamento da energia disponível nessa fração (TOMICH *et al.*, 2004a). Apesar disso, desde que a dieta seja adequadamente balanceada, o menor aproveitamento da energia disponível na fração fibrosa pode, de certa forma, ser compensado pelo mais alto conteúdo de óleo observado nas silagens de girassol, que é um componente altamente energético (TOMICH *et al.*, 2004a).

Para a produção de silagens de boa qualidade, devem-se observar o teor de matéria seca, carboidratos solúveis e a microflora epífita presente nas forrageiras, pois estes têm sido apontados como os principais itens que favorecem a fermentação (PEREIRA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006). Os inoculantes bacterianos são adicionados em silagens para estimular a fermentação láctica, resultando em rápida e intensiva produção de ácido láctico, o que poderá acelerar a queda do pH, melhorando a preservação e minimizando as perdas (PITT, 1990).

O trabalho teve como objetivo avaliar o valor nutricional e a população microbiana da silagem de girassol inoculada com bactérias homo e heterofermentativas associadas com à *L. buchneri* e *B. subtilis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GIRASSOL COMO SILAGEM

Silagem é um alimento volumoso, a partir da forragem verde, conservada por meio de um processo de fermentação anaeróbica e guardada em silos e, chama-se ensilagem o processo de cortar a forragem, colocá-la no silo, compactá-la e protegê-la com a vedação do silo para que haja a fermentação. É usada principalmente para alimentação de bovinos, na época seca ela pode substituir o pasto e, na engorda em confinamento, ela é usada junto com os grãos e farelos (CARDOSO & SILVA, 1995).

O girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma cultura de importância reconhecida e que pode ser cultivado em diversas regiões. É uma ótima alternativa para silagem, pois se desenvolve bem em climas temperados, subtropical e tropical e, também, possui maior tolerância à deficiência hídrica e geadas leves, apresentando como vantagens o alto valor energético e o teor de proteína (GONÇALVES & TOMICH, 1999). O menor ciclo de produção, a capacidade em utilizar a água disponível no solo e a tolerância à ampla faixa de temperaturas são fatores que têm estimulado o cultivo do girassol para a produção de silagem, em regra, indica-se a semeadura do girassol para ensilagem após a colheita da cultura principal, em período de safrinha, ou em locais onde a deficiência hídrica torna inviáveis culturas tradicionalmente utilizadas para esse propósito, como milho e sorgo (TOMICH *et al.*, 2004a).

Dentre as diversas características da cultura, destaca-se seu potencial para aproveitamento econômico, produção de óleo para alimentação humana e a utilização da planta, grãos e resíduos na alimentação animal (MANDARINO, 2005). O cultivo do girassol após a retirada da cultura de verão, com idade de corte entre 104 e 111 dias, pode ser uma opção viável para a produção de silagem (SOUZA *et al.*, 2005). A época de semeadura ideal para a produção de silagem de girassol é aquela que permite satisfazer as exigências climáticas da planta nas diferentes fases de desenvolvimento, reduzir os riscos de eventuais problemas com pragas e doenças e, dessa forma, assegurar boa colheita, além disso, deve-se levar em consideração o enquadramento da produção da silagem de girassol nos sistemas de rotação e sucessão de culturas, aumentando a capacidade de aproveitamento do terreno e da estrutura disponível para produção e armazenamento (TOMICH *et al.*, 2004a).

O uso do girassol na alimentação animal sob a forma de silagem tem surgido como boa alternativa para o Brasil devido aos períodos de déficit hídrico, que impossibilitam a produção de alimentos volumosos de boa qualidade e, conseqüentemente, a manutenção da produção animal todo o ano (EVANGELISTA & LIMA, 2001). Quando a ensilagem é conduzida de forma adequada, o girassol produz silagens com fermentação apropriada à conservação da forragem estocada, geralmente, a silagem de girassol contém alto teor proteico e, devido ao elevado teor de óleo, também possui alto valor energético, contudo, a fração fibrosa geralmente apresenta maior proporção de lignina e menor digestibilidade, quando comparada às silagens de milho e de sorgo, características que podem restringir a aplicação da silagem de girassol para as categorias de animais mais exigentes, como vacas de alta produção em período de lactação (TOMICHA *et al.*, 2004a). O uso da silagem de girassol nos sistemas de produção é uma alternativa técnica e eficiente que têm sido utilizadas com diversos propósitos, dentre estes podemos citar o aporte de volumoso de qualidade no período da escassez de alimento, redução dos custos da dieta do confinamento, suplementação alimentar em pastagens, aumento da escala de produção e maior controle e segurança sobre o manejo alimentar (FREITAS, 2008).

Os primeiros estudos sobre o uso do girassol na forma de silagem foram baseados em análises bromatológicas, avaliações agrônômicas, estudo da dinâmica de fermentação durante o processo de ensilagem, avaliação de aditivos e contribuição das diferentes partes da planta na qualidade e valor nutritivo das silagens, apresentando resultados importantes para o balizamento do melhoramento genético dessa cultura na busca de genótipos específicos para produção de silagem e, atualmente, para complementar estes estudos, os experimentos estão concentrados em avaliações envolvendo a resposta animal (consumo, digestibilidade e desempenho produtivo) e cinética de degradação (PEREIRA *et al.*, 2005).

Vários fatores contribuem para a obtenção de silagem de boa qualidade, porém o teor de matéria seca desempenha um papel fundamental, quer seja aumentando a concentração de nutrientes, quer seja contribuindo para o aumento do consumo da silagem realizado pelo animal, determinando a qualidade da fermentação e, conseqüentemente, da silagem (EVANGELISTA & LIMA, 2001). O baixo teor de matéria seca é considerado um problema para a produção da silagem, mas esse fato está relacionado à ensilagem em períodos precoces de desenvolvimento da planta, já as de alto teor são produzidas quando a colheita é efetuada no período de maturação fisiológica dos aquênios (GONÇALVES & TOMICHA, 1999). As silagens muito secas favorecem a ocorrência de danos por aquecimento e mofo, devido à dificuldade de

compactação, por esse e outros motivos, tem-se recomendado ensilar forragens que apresentam entre 30 e 35% de matéria seca (TOMICCH *et al.*, 2004a). Contudo, objetivando a obtenção de uma forragem de melhor qualidade, estudos têm apontado que o conteúdo de matéria seca adequado para ensilagem do girassol pode situar-se abaixo dos 30% normalmente recomendados para as silagens tradicionais (REZENDE *et al.*, 2002; PEREIRA, 2003). A conservação pela ensilagem baseia-se no processo de conservação em meio ácido, onde o decréscimo do pH pela fermentação limita a ocorrência de processos que promovem a deterioração da forragem, sendo atribuído-lhes valores entre 3,8 a 4,2 como adequados às silagens bem conservadas, dependendo também do conteúdo de umidade da silagem, portanto, para a avaliação do processo fermentativo o valor de pH não deve ser tomado isoladamente, mas deve ser associado ao teor de matéria seca da forragem (TOMICCH *et al.*, 2004a).

O conteúdo de nitrogênio amoniacal da silagem reflete a ação deletéria de enzimas da planta e de microrganismos sobre a fração proteica da forragem e, em geral considera-se que valores máximos estão por volta de 10% em silagens bem conservadas e, como um dos aspectos positivos da silagem de girassol é o seu mais elevado conteúdo de proteína em relação às silagens de milho e de sorgo, a conservação da qualidade dessa proteína durante a estocagem no silo é fundamental para se beneficiar dessa característica (TOMICCH *et al.*, 2004a). Os ácidos orgânicos mais comumente determinantes para uma boa silagem são os ácidos láctico, acético, butírico, isobutírico, propiônico, valérico, isovalérico, succínico e fórmico, sendo os três primeiros de determinação mais importante e, apesar de todos os ácidos formados contribuírem para a redução do pH, o ácido láctico, por apresentar uma maior constante de dissociação, possui papel fundamental nesse processo, enquanto o aumento dos níveis de ácido acético e butírico está relacionado a menores taxas de decréscimo e maiores valores de pH (MOISIO & HEIKOMEN, 1994). A quantidade de ácido láctico necessária para reduzir rapidamente o pH, inibindo a atividade proteolítica e evitando a fermentação indesejável, altera-se com a capacidade de tamponamento e com teor de umidade da forragem e, apesar de o ácido láctico ser o principal ácido da fermentação presente em silagens de boa qualidade, pequenas quantidades de ácido acético podem aparecer, resultando, principalmente, da ação de bactérias lácticas heterofermentativas e enterobactérias sobre os açúcares, podendo, algumas vezes, ser formado pela degradação do citrato, malato e aminoácidos (EVANGELISTA & LIMA, 2001).

2.2 INOCULANTE MICROBIANO

O uso de aditivos microbianos em silagens tem como objetivo inibir o crescimento de microrganismos aeróbicos, inibirem o crescimento de organismos aeróbicos indesejáveis, inibirem a atividade de proteases e deaminases da planta e de microrganismos, adicionarem microrganismos benéficos para dominar a fermentação, formar produtos finais benéficos para estimular o consumo e a produção do animal e melhorar a recuperação de matéria seca da forragem conservada (KUNG Jr. *et al.*, 2003). As mudanças esperadas com esse procedimento incluem rápido declínio no pH, diminuição da concentração de nitrogênio amoniacal, por causa da inibição da proteólise, decréscimo nos níveis de acetato e butirato e incremento no conteúdo de ácido láctico (KUNG *et al.*, 1984). Os efeitos do uso de aditivos, seja sobre a fermentação, composição da silagem ou desempenho animal, estão condicionados ao tipo de inoculante e sua atividade biológica, à quantidade aplicada e ao tipo de forragem, em teor de matéria seca e composição química (HARRISON *et al.*, 1994).

Inoculantes microbianos usados como aditivos incluem bactérias homofermentativas, heterofermentativas, ou a combinação destas. Inoculantes com base em bactérias homofermentativas caracterizam-se pela taxa de fermentação mais rápida, menor proteólise, promovem aumento na produção de ácido láctico, menores teores de ácidos acéticos e butíricos, menor teor de etanol, maior recuperação de energia e matéria seca e rápida redução do pH da massa ensilada (ZOPOLLATTO *et al.*, 2009; KUNG *et al.*, 2003). Já as bactérias heterofermentativas metabolizam o ácido láctico e a glicose presentes durante a fermentação para síntese de ácido propiônico e ácido acético, eficazes no controle de fungos e demais microrganismos deterioradores, sob baixo pH (OUDE ELFERERINK *et al.*, 2001).

O uso de inoculantes microbianos na ensilagem tem proporcionado resultados conflitantes. Dependendo do tipo de inoculante usado, quantidade aplicada, atividade biológica, tipo de forragem, conteúdo de matéria seca e composição química da forragem, os efeitos do uso de aditivos sobre a fermentação, composição da silagem e desempenho animal são diferentes (HARRISON *et al.*, 1994). A obtenção de sucesso no uso de aditivos microbiológicos em silagens depende da habilidade da bactéria inoculada crescer rapidamente na massa de forragem ensilada, da presença de substrato adequado e da população de bactérias inoculadas em relação à população epífita da forragem (ZOPOLLATTO *et al.*, 2009). Já para o insucesso

da utilização de inoculantes são apontadas algumas hipóteses, dentre elas destacam-se: atividade competitiva de população epífita da planta originada a partir de cepas selvagens, baixo teor de açúcares da forragem, efeitos do antecedente histórico da cultura agrícola utilizada como fonte de forragem, excesso de oxigênio, extremos de atividade de água na massa ensilada e problemas na aplicação do produto (MUCK & KUNG Jr., 1997; KUNG Jr. et al., 2003).

2.2.1 *Lactobacillus buchneri*

A bactéria *L. buchneri*, originada do isolamento natural em silagens aerobicamente estáveis, produz durante a fermentação os ácidos lático, acético e 1,2-propanodiol, cujo acetato produzido tem função inibidora sobre espécies de microrganismos deterioradores (leveduras e fungos) que crescem quando a silagem é exposta ao ambiente (DRIEHUIS *et al.*, 1999; OUDE ELFERERINK *et al.*, 2001). Essas bactérias heterofermentativas são uma opção como aditivo, principalmente por promoverem maior estabilidade aeróbica, além de produzirem ácido acético e lático, não produzem etanol graças à ausência da enzima acetaldeído desidrogenase (QUEIROZ, 2006).

O *L. buchneri* também é responsável pela produção de bacteriocinas, que possuem efeitos antimicrobianos, sendo capaz de produzir a buchnericina que tem potencial de ser utilizada no controle de bactérias gram-positivas, as quais estão, geralmente, associadas à deterioração de alimentos (YILDIRIM, 2001). De acordo com DRIEHUIS *et al.* (1999), bactérias heteroláticas são a base para um aditivo específico para os produtores com problemas na retirada da silagem, no caso de silos com dimensionamentos inadequados ou condições inadequadas durante o processo de ensilagem, como longo período para fechar o silo, alto teor de matéria seca, tamanho da partícula inadequada para a ensilagem, problemas na compactação, entre outros. A utilização de *L. buchneri* é uma alternativa para se obter um controle efetivo no crescimento de leveduras e fungos, além de melhorar a qualidade da silagem após a abertura, tornando mais estável em aerobiose, porém, as perdas durante o processo fermentativo da forragem inoculada, precisam ser monitoradas devido à possibilidade de aumento na produção de gases na fermentação (PINTO, 2014).

2.2.2 *Bacillus subtilis*

B. subtilis é um rizobactéria gram-positiva, esporulante, produtora de diversos metabólitos secundários (STEIN, 2005). As cepas do gênero *B. subtilis* são também utilizados como aditivos no processo de ensilagem, porém, com o propósito de diminuir a deterioração aeróbica por produzirem substâncias com ação antimicrobianas, inclusive antibióticos, que possibilitam o controle biológico de fitopatógenos (LANNA FILHO *et al.*, 2010; BASSO *et al.*, 2012). Segundo TODOVORA & KOZHUHAROVA (2009), o *B. subtilis* é uma das mais importantes produtoras de metabólitos com atividade antifúngica e antibacteriana do gênero *Bacillus* e assim controlam desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos (MUCK *et al.*, 1991).

Além do controle de fungos e leveduras o *B. subtilis* pode aumentar o valor nutritivo das silagens, pois as bacteriocinas, que podem ter ação antibiótica, quando o animal ingere a silagem inoculada com esse *Bacillus*, portanto, estas bacteriocininas são proteínas bacterianas com ação antagonista sobre as outras bactérias (BARBOSA & TORRES, 2005). *B. subtilis* pode apresentar também efeito probiótico, que conceitualmente, inclui a ação de microrganismos como promotores de crescimento (LILLY & STILLWELL, 1965). Embora o conceito original sobre probióticos seja baseado em benefícios que ocorrem pós-ruminação, certos probióticos podem até mesmo conferir vantagens no rúmen como à melhoria da digestibilidade (Mc ALLISTER *et al.*, 2011).

Nesse sentido, o aumento no interesse envolvendo a associação de inoculantes pauta-se na melhoria dos processos fermentativos e no aumento da estabilidade aeróbica, fatores almejados em um sistema de produção de ruminantes alimentados com dietas à base de silagem (BRAGIATO, 2016).

2.3 VALOR NUTRICIONAL DA FORRAGEM DE GIRASSOL

O suprimento das necessidades nutricionais de ruminantes depende principalmente do conteúdo de energia e proteína da dieta que podem ser utilizadas pela microbiota ruminal (VIANA *et al.*, 2012). Segundo MELLO & NORNBERG (2004), a fermentação ruminal depende da concentração total de carboidratos e proteínas na dieta e de suas taxas de degradação. O valor nutricional de uma silagem depende essencialmente da cultivar utilizada,

do estágio de maturação no momento do corte e da natureza do processo fermentativo, o que refletirá diretamente no desempenho animal (VILELA, 1985). A composição bromatológica da silagem de girassol difere da observada na silagem de milho ou sorgo por causa de seus maiores teores de proteína bruta, extrato etéreo e fibra bruta (VIANA, *et al.*, 2012).

Segundo SCHINGOETHE *et al.* (1980), este conteúdo de fibra bruta, normalmente de 1,5 a 2 vezes mais alto, observado para a silagem de girassol, em relação à silagem de milho, reduz seu valor nutritivo. Vários autores relataram altos teores de óleo em silagens de girassol, sendo que, até três vezes superiores aos valores observados para silagens de milho, constitui um problema para a produção de silagem (REZENDE *et al.*, 2001; SOUZA, 2002; VALDEZ *et al.*, 1988a). Quando a silagem de girassol é usada em dietas balanceadas, os mais altos conteúdos protéicos e minerais podem representar uma vantagem econômica para as silagens de girassol em relação às demais, uma vez que o nutriente suprido aos animais pelo volumoso poderá ter o seu fornecimento reduzido no concentrado, ou na mistura mineral, por outro lado, embora as silagens de girassol geralmente apresentem menor conteúdo de fibra em detergente neutro (FDN) que as silagens tradicionais, a silagem de girassol contém alta proporção de fibra em detergente ácido (FDA) e de lignina, o que é capaz de restringir a digestibilidade de sua fração fibrosa e, conseqüentemente, o aproveitamento da energia disponível nessa fração (TOMICCH *et al.*, 2004a).

Estima-se que os coeficientes de digestibilidade da matéria seca relativamente baixos observados para silagens de girassol possam ser atribuídos à menor digestibilidade da sua fração fibrosa, afirmação que foi ratificada pelo estudo de CARNEIRO *et al.* (2002), que obtiveram menor digestibilidade efetiva da fibra em detergente neutro da silagem de girassol em relação às silagens de milho e de sorgo e, também pelo experimento de BUENO *et al.* (2001), que em estudo de digestibilidade aparente, observaram menor digestibilidade da fibra em detergente neutro da silagem de girassol comparada à silagem de milho. Apesar disso, desde que a dieta seja adequadamente balanceada, o menor aproveitamento da energia disponível na fração fibrosa pode, de certa forma, ser compensado pelo mais alto conteúdo de óleo observado nas silagens de girassol, que é um componente altamente energético (TOMICCH *et al.*, 2004a).

As silagens produzidas com as variedades confeiteiras apresentam cerca de 3% de extrato etéreo, enquanto as silagens produzidas com girassóis de semente oleosa geralmente apresentam mais de 10% de extrato etéreo (SCHINGOETHE *et al.*, 1980; VALDEZ *et al.*, 1988a; VALDEZ *et al.*, 1988b; TOMICCH *et al.*, 2004b). A maior parte das sementes disponíveis

no mercado nacional é de girassóis destinados à produção de óleo e, na maioria das situações, as análises das silagens de girassol produzidas no país têm revelado alta proporção de extrato etéreo, representando um fator limitante para o seu uso como volumoso único na dieta de ruminantes e, conseqüentemente, pode indicar a possível necessidade de associação com outros alimentos volumosos, uma vez que dietas contendo mais de 7% de extrato etéreo são relacionadas às reduções da fermentação ruminal, da digestibilidade da fibra e da taxa de passagem do trato digestivo, portanto, recomenda-se que as dietas contendo silagem de girassol sejam adequadamente balanceadas, para se evitar perdas no aproveitamento dos alimentos e no desempenho dos animais (TOMICCH *et al.*, 2004a).

Além do valor nutritivo, a capacidade de conservação é outra característica que determina a adequação de uma cultura à ensilagem, de maneira geral, o termo “qualidade de silagem” está relacionado à eficácia do processo fermentativo para conservar a massa ensilada (TOMICCH *et al.*, 2004b). Conforme VILELA (1998), características químicas como o valor de pH, a concentração de nitrogênio amoniacal como porcentagem do nitrogênio total (N-NH₃/NT) e os teores de ácidos orgânicos são as variáveis normalmente empregadas para a avaliação da qualidade da fermentação de silagens.

2.4 PERFIL MICROBIOLÓGICO (POPULAÇÃO MICROBIANA)

Na ensilagem de gramíneas tropicais, considera-se que essas forrageiras possuem concentrações marginais de carboidratos na matéria seca bem inferior às das gramíneas temperadas, além de baixos teores de matéria seca justamente nos estádios de crescimento em que apresentam bom valor nutritivo (McDONALD *et al.*, 1991; VILELA, 1998). Essas características colocam em risco o processo de conservação, por favorecer a ocorrência de fermentações secundárias, resultando em maiores perdas de matéria seca (VILELA, 1998).

Para a produção de silagens de boa qualidade, devem-se observar o teor de matéria seca, carboidratos solúveis e a microflora epífita presente nas forrageiras, pois estes têm sido apontados como os principais itens que favorecem a fermentação (PEREIRA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006). No grupo das bactérias epifíticas, as bactérias produtoras de ácido láctico contribuem para a preservação da silagem por meio da produção

deste e de outros ácidos orgânicos (SAVARIS *et al.*, 2007). A presença e a quantidade destes grupos de bactérias determinam se a fermentação é adequada e se há necessidade de se aplicar inoculantes microbianos (CHUNJIAN *et al.*, 1992). Os inoculantes bacterianos são adicionados em silagens para estimular a fermentação láctica, resultando em rápida e intensiva produção de ácido láctico, o que poderá acelerar a queda do pH, melhorando a preservação e minimizando as perdas (PITT, 1990).

O processo de ensilagem é complexo, devido ao grande número de microrganismos envolvidos e, pode ser considerada uma metabiose, ou seja, ocorre desenvolvimento simultâneo e sucessivo de microrganismos de diversos gêneros e espécies, que dependem principalmente do pH, do potencial de oxirredução e do tipo e quantidade de substratos presentes no meio (PENTEADO *et al.*, 2007). No início do processo de ensilagem, microrganismos aeróbicos, bem como bactérias anaeróbicas facultativas, capazes de se desenvolver em pH mais elevado predominam no meio, à medida que o pH reduz e o oxigênio é consumido por microrganismos aeróbicos e pelas células das plantas, as bactérias anaeróbicas e anaeróbicas facultativas tolerantes à acidez capazes de se desenvolver em um meio com potencial de oxirredução mais baixo, substituem as anteriores (PAHLOW *et al.*, 2003). A população microbiana da cultura forrageira antes da ensilagem é completamente diferente daquela encontrada durante o processo de fermentação ou na silagem, tanto em número, como taxonomicamente (PENTEADO *et al.*, 2007).

Muitas espécies são bactérias aeróbicas obrigatórias, as quais não contribuem para a preservação da silagem, cujo crescimento é inibido, imediatamente após o fechamento do silo (PAHLOW *et al.*, 2003). As bactérias lácticas epifíticas são as mais abundantes e atuantes no processo fermentativo de silagens, no entanto, a população dessas bactérias nas plantas é muito inferior àquela de bactérias aeróbicas, o que, muitas vezes, acarreta em falha do processo fermentativo (PEREIRA & SANTOS, 2006). As enterobactérias são o segundo grupo bacteriano mais numeroso da microflora epifítica ativa no silo e, portanto, o mais importante em competição com a microflora de bactérias ácido-láticas (BAL), produzindo, principalmente, ácido acético (PAHLOW *et al.*, 2003). Silagens com elevada população de enterobactérias são caracterizadas por elevada produção de ácido acético, valores de pH elevados e elevada produção de amônia e aminas (PEREIRA & SANTOS, 2006).

Durante o processo de ensilagem e depois de alcançada a condição de anaerobiose no silo, é importante inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis, principalmente, as

enterobactérias, os clostrídeos e algumas espécies de *Bacillus* e leveduras, para se evitar que estabeleçam competição por substrato com as BAL (McDONALD *et al.*, 1991). Fermentações indesejáveis provocadas, principalmente, por bactérias do grupo *Clostridium* aumentam as perdas da matéria seca e reduzem a qualidade nutricional da silagem (MORAIS *et al.*, 1996). As alterações ocorridas nos primeiros dias após a ensilagem são críticas para o sucesso da fermentação subsequente, pois, se as condições são apropriadas, as bactérias lácticas acidificam rapidamente o meio a uma extensão que os microrganismos indesejáveis não sobrevivem, resultando em uma silagem estável, com baixo pH e, se o pH não é reduzido rapidamente, os microrganismos indesejáveis podem competir pelos nutrientes, reduzindo as chances de obtenção de uma silagem estável, portanto, a maneira mais efetiva de se inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis é promover a redução da fermentação láctica (CASTRO *et al.*, 2006).

Um método alternativo para inibição do crescimento de bactérias indesejáveis seria a redução do teor de umidade da forragem pelo emurchamento do material que antecede a ensilagem, pois as bactérias lácticas têm alta tolerância à condição de baixa umidade e podem dominar a fermentação em materiais ensilados com alto conteúdo de matéria seca (McDONALD *et al.*, 1991). Outra importante etapa na utilização de silagens é o manejo de pós-abertura do silo e de remoção da silagem para o fornecimento aos animais, pois promove a aeração do ambiente, que passa de estritamente anaeróbico, um dos responsáveis pela conservação da forragem, para ser aeróbico (ANDRADE *et al.*, 2010), sob essa condição, microrganismos que permanecerem dormentes na ausência de oxigênio multiplicam-se rapidamente, promovendo intensa atividade metabólica, gerando calor e consumindo nutrientes, elevando as perdas de MS e reduzindo o valor nutritivo do alimento (SIQUEIRA *et al.*, 2005), resultando na deterioração da silagem, que na prática, é geralmente manifestada pelo aparecimento de fungos (CASTRO *et al.*, 2006). A deterioração aeróbica das silagens, ocasionada por fungos e leveduras presentes na forragem antes da ensilagem, é indesejável, em razão da grande perda de nutrientes, associada ao baixo consumo voluntário do material e até mesmo à rejeição completa da silagem pelos animais (McDONALD *et al.*, 1991). A estabilidade aeróbica da silagem é definida como sendo o tempo observado para que a massa de silagem, após a abertura do silo, apresente elevação na temperatura (de 1 a 3°C) em relação à temperatura ambiente (OUDE ELFERINK, 2001).

Adicionar aditivos biológicos como enzimas durante a ensilagem de forragens aumentam a disponibilidade de substrato para as bactérias produtoras de ácido láctico, pela degradação de carboidratos complexos em carboidratos solúveis (MUCK & KUNG, 1997). Pelo processo de hidrólise, as enzimas transformam os carboidratos estruturais em substrato fermentescível para as bactérias lácticas (McDONALD *et al.*, 1991). Como a concentração de carboidratos solúveis representa um fator limitante para o desenvolvimento de bactérias lácticas homofermentativas presentes nos inoculantes bacterianos para silagens, pode-se inferir que a associação de inoculantes bacterianos e enzimas estimulam a fermentação de forragens pobres em substratos prontamente fermentescíveis, desse modo, o controle do crescimento de microrganismos torna-se necessário, como forma de maximizar as fermentações desejáveis, para obtenção de produtos mais estáveis e de melhor qualidade nutricional (CASTRO *et al.*, 2006).

Assim, o processo de ensilagem tem sido caracterizado como complexo, devido aos vários fatores que se relacionam como a espécie vegetal utilizada e variação da microflora epifítica (PENTEADO *et al.*, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências do setor de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados - FCA/UFGD, localizada no município de Dourados – MS no período de maio a setembro de 2013, com latitude de 22°14'S, longitude de 54° 49'W e altitude de 450 m.

O delineamento experimental utilizado foi em um delineamento inteiramente casualizado compondo 3 tratamentos, com 20 silos por tratamento, sendo um total de 60 silos. Os tratamentos foram:

- 1) Controle (CON), sem inoculante;
- 2) LB, adição de *L. buchneri* de 2.6×10^{10} ufc/g;
- 3) LBBS, adição de *L. buchneri* de 2.6×10^{10} ufc/g + *B. subtilis* 1×10^9 ufc/g.

Antes da ensilagem, amostras (1000 gramas) da forragem fresca foram armazenadas a -20 °C para análises químicas aos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA), lignina (LIG) e cinzas (CZ), conforme técnicas descritas por AOAC (2002). O teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia líquida de lactação foram calculados segundo o (NRC, 2001). A composição química após a colheita é mostrada na Tabela 1.

Como silos experimentais foram utilizados baldes de Polietileno de 30 cm de altura e 30 cm de diâmetro, com tampas com válvulas de *Bunsen* para permitir o escape dos gases. No fundo dos silos, foi colocado areia seca (2kg) separada da forragem por uma tela e um tecido de náilon para quantificação do efluente produzido.

A compactação do material picado foi realizada com os pés objetivando atingir densidade de 650 kg/m³ de forragem o volume de cada silo experimental, foi calculado descontando-se o espaço ocupado pela areia e pesando-se a quantidade de forragem necessária para obtenção da densidade desejada. Após a compactação da forragem, os silos foram vedados com fita adesiva, pesados e armazenados. Aos 15, 30, 45 e 60 dias de fermentação, foram novamente pesados e coletadas amostras de 5 silos de cada tratamento para determinação das perdas por gases.

Tabela 1. Composição química do girassol planta inteira antes do momento a ensilagem (%).

Matéria seca	31,57
Matéria orgânica	91,43
Proteína bruta	9,73
Extrato etéreo	5,86
Fibra em detergente neutro	48,08
Carboidrato não fibroso ^a	28,06
Fibra em detergente ácido	35,87
Lignina	6,96
Cinzas	8,29
Energia líquida de lactação (MJ) ^b	6,17

^bDe acordo com o NRC (2001).

3.1 VALOR BIOQUÍMICO E NUTRICIONAL

Na abertura dos silos, após homogeneização da silagem, uma amostra de 500 gramas foi retirada para realização de análises bromatológicas de MS, cinzas, MO, PB, FDN, FDA, LIG e NDT segundo AOAC (2002), VAN SOEST et al. (1963 e 1967) e NRC, (2001) e digestibilidade *in vitro* da MS e FDN segundo metodologia descrita por TILLEY e TERRY (1963).

O teor de fibra em detergente neutro (FDN) e da fibra em detergente ácido (FDA) das plantas forrageiras foi obtido pelo método convencional descrito por Van Soest, (1963) e Van Soest (1967), respectivamente. Os reagentes necessários para preparar um litro do detergente neutro pelo método de Van Soest (1963) foram: um litro de água destilada; 30,0 g de sulfato de sódio; 18,61 g de EDTA sal dissódico; 6,81 g de borato de sódio hidratado; 4,56 g de fosfato ácido de sódio anidro e 10 mL de trietileno glicol, não foi utilizada a enzima alfa amilase termo lábil devido os alimentos volumosos apresentarem baixo teor de amido. Para o preparo do detergente ácido (um litro) pelo método de Van Soest (1967) foram utilizados: 20 g de brometo-cetil-trimetilamônio e 27,7 mL de ácido sulfúrico (96 -98% de pureza). Para a determinação da FDN e da FDA pelo método convencional de Van Soest (1963, 1967), respectivamente, foi utilizado 1,0 g de amostra condicionada em copos de vidro com capacidade 600 mL proveniente do digestor de fibra modelo MA- 455 Marconi®, adicionando-se 100 mL da solução detergente

neutro ou detergente ácido, respectivamente. A solução contendo as amostras permaneceu em fervura durante 60 minutos a 100o C, em seguida o conteúdo foi filtrado em cadinho filtrante com porosidade de 50 a 150 µm – no 2. Após a filtração do detergente neutro ou ácido foi adicionado 20 mL de acetona dentro de cada cadinho e filtrado com auxílio de bomba a vácuo. Os cadinhos de vidro foram acondicionados na estufa a 105o C por oito horas para obtenção do resíduo com peso constante. Ao final destes procedimentos os cadinhos de vidro filtrantes com resíduo (FDN ou FDA) foram colocados em forno mufla e permaneceram nele por quatro horas com temperatura de 470o C, para queima da matéria orgânica e consequente limpeza da pedra porosa. Em seguida os cadinhos foram mergulhados em solução sulfocrômica para limpeza do resíduo inorgânico por 2 horas. Posteriormente os cadinhos foram lavados com água corrente e testados quanto a sua capacidade de filtração na bomba a vácuo.

3.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Uma amostra do material antes de ser ensilado foi enviado para o isolamento de bolores e levedura, bem como contagem bacteriana total (CBT).

Os silos foram abertos após 35 dias de fermentação. As amostragens foram coletadas, sendo retiradas de várias partes dos silos. Foram utilizados 10 gramas de cada amostra para 90 mL de solução salina esterilizada para a diluição seriada de 10⁻¹ até 10⁻⁶ em tubos de ensaio. As quantificações dos microrganismos foram feitas em triplicatas para cada diluição e meio de cultura, sendo utilizado o Ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) para contagem de bactérias lácticas, o Ágar Nutriente para contagem total de bactérias aeróbicas e anaeróbicas, estas com incubação a 37 °C por 48 horas; para contagem de bolores e leveduras o Ágar PDA (Potato dextrose Ágar) com incubação a 26 °C por 120 horas. A atividade das enzimas foi mensurada de acordo com metodologia descrita por DICK et al., (1996).

Os dados obtidos foram submetidos ao SAS (Version 9.1.3, SAS Institute, Cary, NC 2004), verificando a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo PROC UNIVARIATE.

Os dados foram analisados, pelo PROC MIXED de acordo com a seguinte modelo:

$$Y_i = \mu + T_i + e_i$$

Onde: Y_i = variável dependente, µ = média geral, T_i = efeito de tratamento (j = 1 a 3). Os graus de liberdade foram corrigidos por DDFM= kr. Os dados obtidos foram submetidos à

análise de variância pelo comando PROC MIXED do SAS, versão 9.0 (SAS, 2009), adotando-se nível de significância de 5%.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*

Os tratamentos não afetaram o pH e a concentração de nitrogênio amoniacal da silagem de girassol ($P \geq 0,114$). A associação de LB + BS diminuiu a acidez titulável das silagens ($P = 0,031$). Os inoculantes diminuíram o teor de MS da silagem de girassol ($P = 0,001$). O maior nível de EE foi observado quando as silagens foram tratadas com LB, enquanto que os níveis intermediários foram observados para o CON, sendo observados níveis baixos para as silagens tratadas com LB + BS ($P = 0,004$). Os inoculantes mostraram efeitos positivos sobre a digestibilidade *in vitro* de nutrientes, nos quais aumentaram as digestibilidades de MS, MO e FDN em comparação com CON ($P \leq 0,05$) como mostra a Tabela 2.

Tabela 2- Valor bioquímico e nutricional de acordo com os tratamentos experimentais

Item	Tratamentos ¹			EPM	Valor de P
	CONT	LB	LBBS		
<i>Bioquímico</i>					
pH	3,31	3,19	3,26	0,02	0,114
Acidez total titulável	2,10 ^a	1,93 ^a	1,43 ^b	0,06	0,031
NH ₃ -N (mg/dL)	5,87	6,73	5,38	0,28	0,144
<i>Nutrientes</i>					
Matéria seca	29,21 ^a	25,94 ^b	26,95 ^b	0,30	0,001
Matéria orgânica	90,67	90,72	90,48	0,06	0,334
Proteína bruta	13,51	13,14	13,87	0,37	0,456
Extrato etéreo	14,02 ^{ab}	15,51 ^a	12,45 ^b	0,39	0,004
Carboidratos não fibrosos	24,25	20,84	22,31	0,70	0,141
Fibra em detergente neutro	38,89	41,21	41,84	0,57	0,087
Fibra em detergente ácido	33,52	30,95	31,02	0,59	0,129
Lignina	4,87	5,10	4,55	0,14	0,324
Cinzas	9,32	9,27	9,51	0,06	0,310
Nutrientes digestíveis totais	71,06	70,16	69,92	0,22	0,087
Energia líquida	1,55	1,53	1,53	0,01	0,078
<i>Digestibilidade in vitro</i>					
Matéria seca	80,13 ^b	85,81 ^a	85,19 ^a	0,24	0,002
Matéria orgânica	81,86 ^b	87,56 ^a	86,93 ^a	0,24	0,045
Fibra em detergente neutro	70,76 ^b	73,87 ^a	72,79 ^a	0,78	0,050
Fibra em detergente ácido	53,82	51,45	52,01	0,47	0,548

¹CONT (Controle), LB (*Lactobacillus buchneri* $2,6 \times 10^{10}$), LBBS (*Bacillus subtilis* 1×10^9 + *Lactobacillus buchneri* 9×10^9)

De acordo com Gonçalves et al.(2009), têm-se atribuído pH entre 3,8 a 4,2 como adequados às silagens bem conservadas. Entretanto, o pH apropriado para promover a eficiente conservação da forragem ensilada depende do conteúdo de umidade da silagem.

Portanto, para a avaliação do processo fermentativo, o pH não deve ser tomado isoladamente, mas deve ser associado ao teor de matéria seca da forragem. As silagens de girassol, geralmente, apresentam valores elevados de pH. Todavia, Tomich et al. (2004), avaliando as silagens de 13 cultivares, observaram que o valor de pH foi positivamente correlacionado com o conteúdo de matéria seca, indicando que as silagens mais úmidas apresentaram pH mais baixos.

O teor de nitrogênio amoniacal da silagem reflete a ação deletéria de enzimas da planta e de microrganismos sobre a fração proteica da forragem. Em geral, considera-se que valores inferiores a 10% são adequados para silagens bem-conservadas. Como um dos aspectos positivos da silagem de girassol é o seu mais elevado valor proteico em relação às silagens de milho e de sorgo. Em relação à qualidade da fermentação, a maior parte dos estudos tem revelado teores de nitrogênio amoniacal abaixo de 10% em silagens de girassol (Valdez et al., 1988a, b; Tomich et al., 2004), indicando a aptidão da planta para a ensilagem quanto à conservação da qualidade da fração proteica.

O teor de matéria seca deve ser associado ao valor de pH ao avaliar o processo de fermentação, pois necessita de um valor de pH inferior a 4,0 para proporcionar uma boa conservação da forragem, estando este dependente do conteúdo de umidade presente na silagem, que deve ser entre 60 e 70%. De acordo com Gonçalves e Tomich (1999) em um estudo realizado sobre a qualidade de silagens de diferentes genótipos, constataram que silagens com maiores teores de matéria seca apresentavam maiores valores de pH, devido o teor de pH ser dependente do conteúdo de umidade presente na silagem. Após o corte e ensilagem, inicia-se a hidrólise de proteínas, resultando em aumento do nitrogênio não-protéico nas primeiras 24 horas de fermentação (McDONALD et al., 1991), onde a extensão da degradação protéica varia com a espécie da planta, taxa e extensão da queda do pH, teor de matéria seca e temperatura, mas o conteúdo de proteína pode ser reduzido em 50-60%, mesmo em silagens bem preservadas conforme as figuras 1-5.

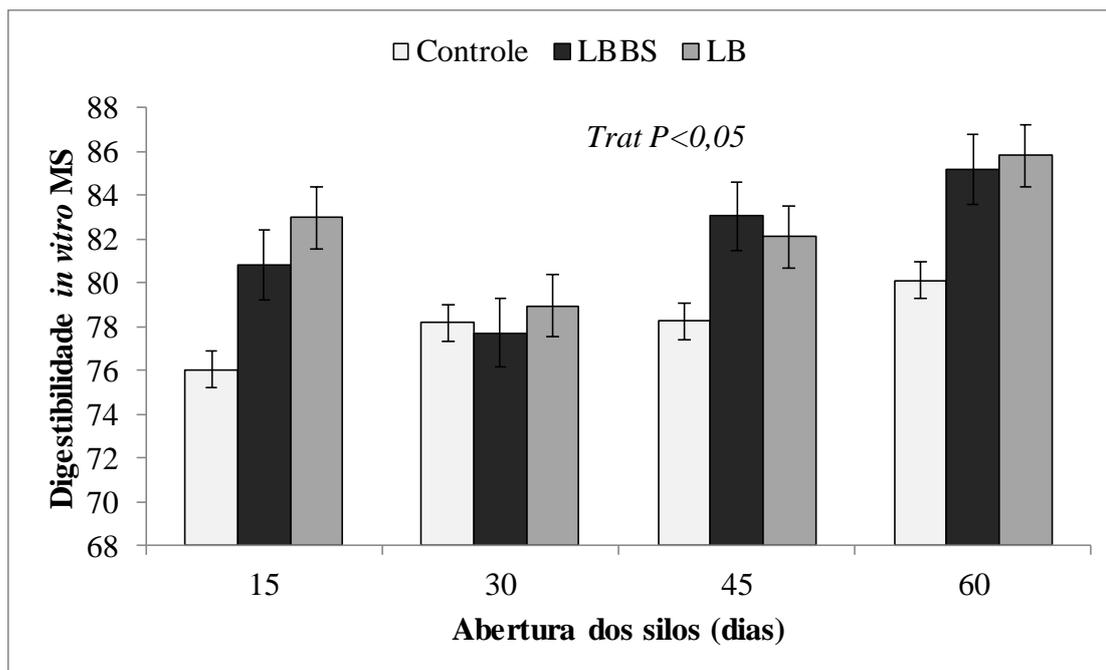
Segundo Mello et al. (2004) em uma avaliação do potencial produtivo e qualitativo de híbridos de milho, sorgo e girassol para ensilagem, os componentes da parede celular das silagens (FDN, FDA, hemicelulose, celulose e lignina em detergente ácido) apresentaram diferenças significativas entre as culturas, mas a silagem de girassol apresentou menores teores de FDN e hemicelulose comparados ao milho e sorgo.

Tomich et al. (2004b), avaliando as características químicas e digestibilidade “in vitro” de treze cultivares de girassol, encontraram valores médios de 45,8% para FDN, 35,7% para FDA e 6,5% para lignina, e concluíram que altos valores de FDA e de lignina podem restringir a qualidade da fração fibrosa e da utilização para categorias mais exigentes.

Pesquisas realizadas nos últimos anos, como descritos por Evangelista e Lima (2001), revelaram valores em médias variações de 46,9% a 56,7% para digestibilidade “in vitro” da matéria seca da silagem de girassol.

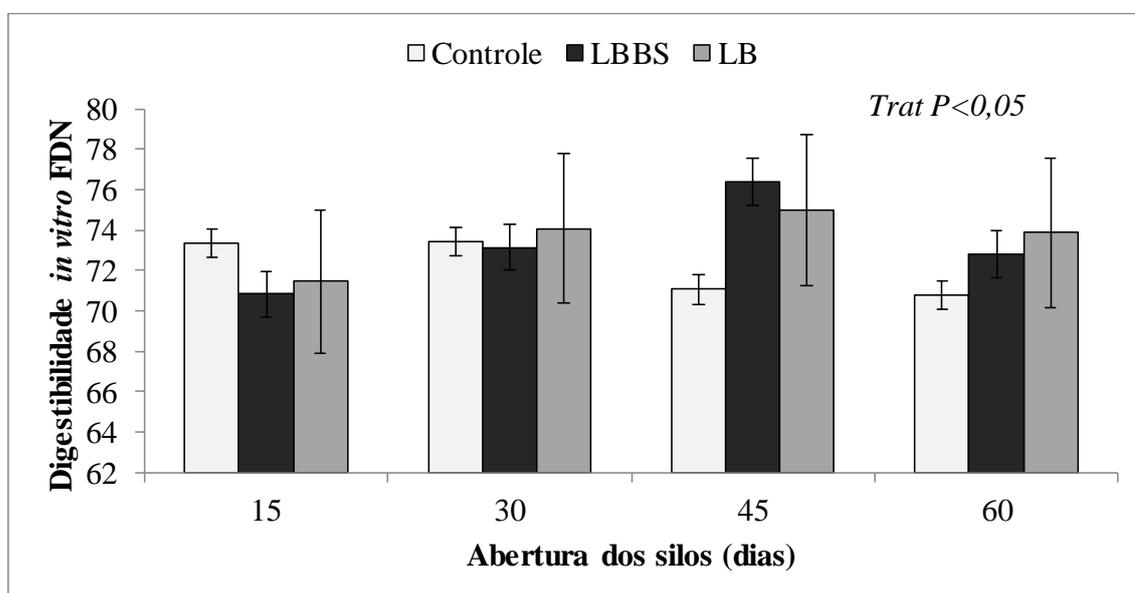
Leite (2002) estudou o desempenho de vacas holandesas alimentadas com silagens de girassol e milho, em que a silagem de girassol promoveu redução significativa de 17% na ingestão de matéria seca, porém em uso combinado (substituição parcial de 34% ou 66%) não se observou redução no consumo de matéria seca. Silva et al. (2004) não recomendam a substituição total da silagem de milho por silagem de girassol, devido a reduções nas produções de leite (de 27,5 para 24,0 kg dia⁻¹), na proteína (de 0,84 para 0,70%) e no extrato seco total (de 3,0 para 2,6%) em dietas de vacas leiteiras.

Figura 1 – Quantidade de MS na digestibilidade in vitro de acordo com os tratamentos experimentais em diferentes dias de abertura.



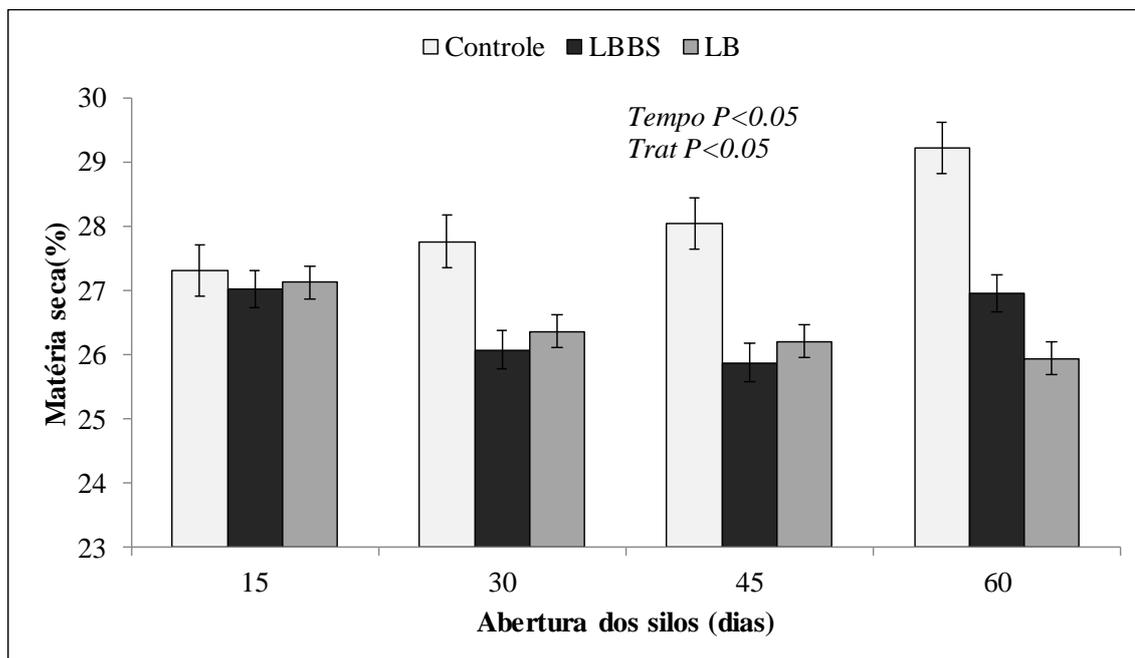
A quantidade de MS na digestibilidade *in vitro* se mostrou maior quando utilizado os inoculantes LB e LB + BS. Nos primeiros 15 dias foram muito superior ao CON, com 30 dias houve pouca diferença entre eles, mas a partir dos 45 dias eles dispararam em comparação ao CON, dando uma diferença de 6,6%.

Figura 2 - Quantidade de FDN na digestibilidade *in vitro* de acordo com os tratamentos experimentais em diferentes dias de abertura.



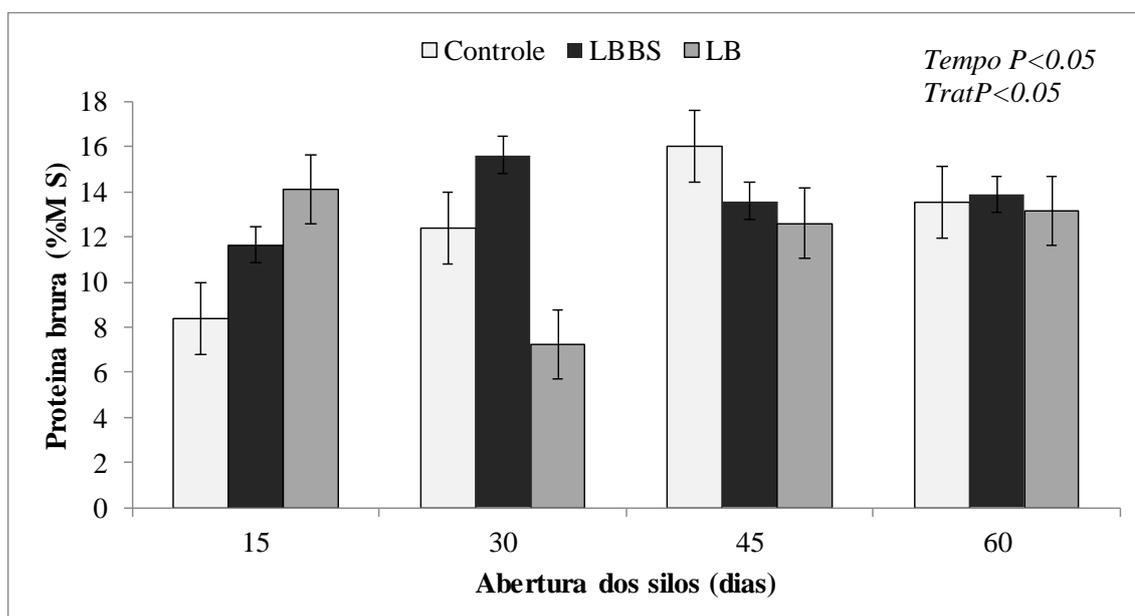
A quantidade de FDN na digestibilidade *in vitro* ao final se mostrou maior quando inoculada com LB e LB + BS, cerca de 3,5% em relação ao CON. Os valores se mantiveram estáveis até os 30 dias. Após os 30 dias, eles tiveram um aumento, e depois aos 45 dias houve um decréscimo.

Figura 3 – Percentagem de matéria seca (MS) de acordo com os tratamentos experimentais em diferentes dias de abertura.



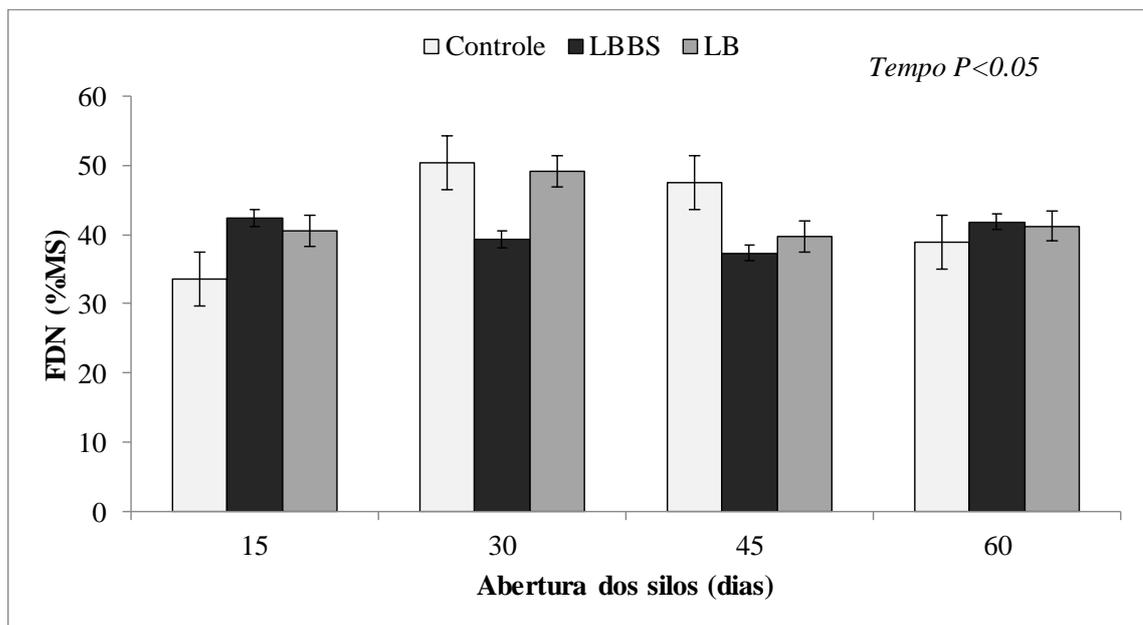
Os níveis se mantiveram estáveis nos primeiros 15 dias. Com o passar dos dias a percentage de MS aumentou gradativamente na silagem CON e as inoculadas se mantiveram estáveis, tendo um pequeno acréscimo aos 60 dias.

Figura 4 – Percentagem de proteína bruta de acordo com os tratamentos experimentais em diferentes dias de abertura.



Nos primeiros 15 dias a percentagem de proteína foi maior na silagem inoculada com LB. Aos 30 dias, houve um aumento na percentagem de CON e na inoculada com LBBS, e diminuição com o inoculante LB. Com 45 dias a CON se mostrou com maior percentagem que as inoculadas. E aos 60 dias ambos os tratamentos não mostraram diferença significativa.

Figura 5 – Percentagem de FDN de acordo com os tratamentos experimentais em diferentes dias de abertura.



A percentagem de FDN aos 15 dias se mostrou maior nos tratamentos com inoculantes LB e LB + BS. Aos 30 dias ocorreu um aumento no tratamento CON e LB, e uma pequena diminuição na LB + BS, que se manteve até os 60 dias, onde não houve diferença significativa.

4.2 MICROBIOLOGIA

Embora os tratamentos não tenham afetado as bactérias totais ($P=0,316$) e as bactérias anaeróbias ($P=0,0743$), as silagens tratadas com LB ou LB + BS apresentaram menores concentrações de bactérias aeróbias, bolores e leveduras e maiores quantidades de bactérias

láticas quando comparadas com CON. Além disso, a silagem tratada com LB apresentou menor concentração de fungos e leveduras do que aquelas tratadas com LB + BS.

Tabela 3- Microbiologia de acordo com os tratamentos experimentais

Item	Tratamentos ¹			EPM	Valor de P
	CONT	LB	LBBS		
<i>Bactérias log₁₀</i>					
Total	7,45	7,71	7,54	0,18	0,316
Aeróbicas	6,00 ^a	4,49 ^b	4,85 ^b	0,15	0,001
Anaeróbicas	7,13	7,41	7,24	0,14	0,743
Láticas	5,52 ^b	7,29 ^a	7,67 ^a	0,11	0,001
<i>log₁₀</i>					
Bolores e leveduras	6,88 ^a	4,12 ^c	5,85 ^b	0,12	0,001

¹CONT (Controle), LB (*Lactobacillus buchneri* 2,6x10¹⁰), LBBS(*Bacillus subtilis* 1x10⁹ +*Lactobacillus buchneri* 9x10⁹)

Considera-se o número de aproximadamente 10⁸ bactérias láticas por grama de material ensilado como suficiente para garantir uma fermentação apropriada à conservação da silagem (Muck, 1988).

A perda de estabilidade aeróbia das silagens geralmente é manifestada por aumento de temperatura e alteração do pH. O acúmulo de temperatura após a abertura do silo é reflexo da intensidade de reações promovidas por fungos filamentosos, leveduras e bactérias aeróbias (Amaral et al., 2008). Segundo Guim et al. (2002), a respiração dos microrganismos aeróbios pode ser considerada como um dos principais agentes que influenciam a qualidade das silagens. A quantidade de microrganismos aeróbios presentes na silagem é determinada pela presença deles na planta antes do corte, assim como do grau de desenvolvimento durante a fase aeróbia inicial (Vilela et al., 2003).

As bactérias produtoras de ácido acético podem ser iniciadoras do processo de deterioração aeróbia, metabolizando etanol e produzindo ácido acético, em situações de baixa quantidade de etanol elas podem metabolizar ácido acético e produzir CO₂ (Muck, 2010). Estas bactérias ao consumir estes substratos provocam aumento do pH, possibilitando assim, o desenvolvimento de outros microrganismos deteriorantes, como os *Bacillus* spp, os quais apresentam maior importância em silagens com pH superior a 4,5.

Estirpes homofermentativas ajudam a garantir uma rápida supressão das estirpes anaeróbias durante o início de armazenamento, aumentam a recuperação de matéria seca e melhoram o desempenho animal por meio de mecanismos que nós não entendemos completamente. Inoculantes contendo *Lactobacillus buchneri*, uma espécie heterofermentativa capaz de fermentar o ácido láctico a ácido acético, são aditivos recentes. O ácido acético inibe o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, aumentando a estabilidade aeróbia de silagens na alimentação (MUCK, Richard E., 2010).

5 CONCLUSÃO

A adição de inoculantes microbianos influenciou de maneira positivamente o valor nutricional e a qualidade microbiológica da silagem de girassol, sendo recomendado a abertura do silo aos 42 dias de fermentação.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANDRADE, A. P.; QUADROS, D. G.; SILVA, P. H. S.; ARAÚJO, J. A. M.; ALMEIDA, J. A. R.; SANTOS, L. I. J. Estabilidade aeróbia da silagem de capim-elefante com diferentes proporções de casquinha de soja de fubá de milho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47. **Anais...** Salvador: SBZ, 2010.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. Microbiologia básica. São Paulo. **Editora Atheneu**, 2005.

BASSO, F. C.; LARA, E. C.; ASSIS, F. B.; RABELO, C. H. S.; MORELLI, M.; REIS, R. A. Características da fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com *Bacillus subtilis*. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, Salvador, v.13, n.4, p.1009-1019 out./dez., 2012.

BRAGIATO, U. C. Desempenho e qualidade da carne de cordeiros alimentados com silagem inoculada com *Lactobacillus Plantarum* e *Bacillus subtilis*. **Dissertação...** Universidade Estadual Paulista, Núcleo de Mestrados. Jaboticabal, 2016 v.55.

BUENO, M. S.; FERRARI JÚNIOR, E.; LEINZ, F. F. Silagens de milho ou girassol com diferentes proporções de ração concentrada na dieta de ovinos. In: REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001.

CARDOSO, E. G.; SILVA, J. M. da. Silos, silagem e ensilagem. **Embrapa Gado de Corte**. Campo Grande, MS, fev. n.2, 1995.

CARNEIRO, J. C.; SILVA, J. O.; VIANA, A. C. Avaliação da digestibilidade "in situ" da matéria seca e da fibra em detergente neutro de silagens de milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e girassol (*Helianthus annuus*). In: REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39, 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002.

CASTRO, F. G. F.; NUSSIO, L. G.; HADDAD, C. M.; CAMPOS, F. P. de; COELHO, R. M.; MARI, L. J.; TOLEDO, P. de A. Perfil microbiológico, parâmetros físicos e estabilidade

aeróbica de silagens de capim-tifton85 (*Cynodon* sp.) confeccionadas com distintas concentrações de matéria seca e aplicação de aditivos. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa-MG. v.35, n.2, p.358-371, 2006.

CHUNJIAN, L.; BOLSEN, B. E.; FUNG, D. Y. C. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling periods of alfafa and maize. **J. Appl. Bacteriol.**, 73: 375-387. 1992.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.583-594, 1999.

EVANGELISTA, A. R.; LIMA, J. A. Utilização de silagem de girassol na alimentação animal. p.177-217. Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservada. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO, 2001.

FREITAS, L. DA S. Desempenho e comportamento ingestivo de novilhos de corte confinados alimentados com diferentes proporções de silagem de girassol (*Helianthus annuus* L.) na dieta. **Dissertação...** Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Santa Maria, RS, Brasil, 2008. p.82.

GONÇALVES, L. C.; TOMICH, T. R. Utilização do girassol como silagem para alimentação bovina. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE GIRASSOL, 13, SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE A CULTURA DE GIRASSOL, 1, 1999, Itumbiara. **Embrapa Soja**. Londrina. 1999. p.21-30.

HARRISON, J.H.; BLAUWIEKEL, R.; STOKES, M.R. Fermentation and utilization of grass silage. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.10, p.3209-3235, 1994.

KUNG JR., L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W. *et al.* Added ammonia as microbial inoculant 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.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA, 2003. p.305-360.

- LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v.4, n.2, p.12- 20, 2010.
- LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. *Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms*. **Science**, New York, v. 147, p. 747-748, 1965.
- MANDARINO, J. M. G. Óleo de girassol como alimento funcional. In: LEITE, R. M. V. B. de C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. (eds). Girassol no Brasil. **Embrapa Soja**. Londrina, 2005, p.43-49.
- MC ALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.; ALAZZEH, A. Y.; BAAH, J.; TEATHER, R. M.; STANFORD, K. The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, n.91 p.193-211. 2011.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. The biochemistry of silage. 2. ed. **Science**, Marlow: Chalcomb Publisher, 1991. 340 p.
- MELLO, R.; NÖRNBERG, J. L. Fracionamento dos carboidratos e proteínas de silagens de milho, sorgo e girassol. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1537-1542, 2004.
- MOISIO, T.; HEIKOMEN, M. Lactic acid fermentation in silage preserved with formic acid. **Animal Feed Science and Thecnology**, 47(1):107-124, 1994.
- MORAIS, J. P. G.; *et al.* Efeito de inoculante bacteriano em silagem de milho quanto à digestibilidade “in vivo” e fermentação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1996. p. 425-427.
- MUCK, R. E.; PITT, R. E.; LEIBENSPERGER, R. Y. A model of aerobic fungal growth in silage. Microbial characteristics. **Grass Forage Sci.**, n.46(3) p.283-290, 1991.
- MUCK, R.E.; KUNG Jr., L. Effects of silage additives on ensiling. Silage: field to feedbunk. NRAES-99. **Hershey: North America Conference, Ithaca: Northeast Reg. Agric. Eng. Serv.**, Coop. Ext., 1997. p.187-199.
- NEUMANN, M.; OLIBONI, R.; OLIVEIRA, M.R.; GÓRSKI, S.C.; FARIA, M.V.de; UENO, K.U.; MARAFON, F. Girassol (*Helianthus annuus* L.) para produção de silagem de planta inteira. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v2, n3, Set.- Dez. 2009.

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

PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F. Microbiology of ensiling. In: Silage Science and Technology. Madison. **Proceedings...** Madison: ASCSSA-SSSA, Agronomy, 42: 31- 93. 2003.

PENTEADO, D. C. S.; SANTOS, E. M.; CARVALHO, G. G. P. de; OLIVEIRA, J. S. de; ZANINE, A. M.; PEREIRA, O. G.; FERREIRA, C. L. L. F. Inoculação com *Lactobacillus plantarum* da microbiota em silagem de capim-mombaça. **Arch. Zootec.** 56 (214): 191-202. 2007.

PEREIRA, L. G. R. Potencial forrageiro da cultura do girassol (*Helianthus annuus*) para produção de silagem. 160f. **Tese...** (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte. 2003.

PEREIRA, L. G. R.; MAURÍCIO, R. M.; GONÇALVES, L. C.; TOMICH, T. R.; RODRIGUES, J. A. S.; RODRIGUEZ, N. M. Avaliação das silagens de girassol (híbrido m734) obtidas em diferentes épocas de ensilagem pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. **Braz. J. Vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.42, n.4, p.276-283, 2005.

PEREIRA, O. G.; SANTOS, E. M. Microbiologia e processo de fermentação de silagens. In: III Simpósio sobre Manejo Estratégico da Pastagem. **Anais...** Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. 1: 393-430. 2006.

PEREIRA, O. G.; SANTOS, E. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Populações microbianas em silagem de capim-mombaça de diferentes idades de rebrotação. In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** UFPB. João Pessoa. 2006.

PINTO, S. Natamicina como aditivo para silagens de milho. **Dissertação...** Universidade Federal do Paraná, Núcleo de Pós-graduação. Curitiba, 2014 f. il.108.

PITT, R. E. Silage and hay preservation. Ithaca: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, **Science**. 1990. 53p.

QUEIROZ, O. C. M. Associação de aditivos microbianos na ensilagem e o desempenho de vacas em lactação recebendo silagem de cana-de-açúcar comparada a volumosos tradicionais. **Dissertação...** Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Núcleo de Mestrados. Piracicaba. p.99, 2006.

REZENDE, A. V.; EVANGELISTA, A. R.; SIQUEIRA, G. R. Avaliação do valor nutritivo da silagem de girassol (*Helianthus annuus L.*) em diferentes épocas de corte na safra. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001b. p.234-236.

REZENDE, A. V.; EVANGELISTA, A. R.; SIQUEIRA, G. R.; TOSI, H.; SILVEIRA, A. C.; BERNARDES, T. F. Avaliação do potencial do girassol (*Helianthus annuus L.*) como planta forrageira para ensilagem na safrinha, em diferentes épocas de cortes. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, p.1548-1553, 2002. Edição especial.

SANTOS, E. M.; PEREIRA, O. G.; FERREIRA, C. L. L. Isolamento, identificação e caracterização de *Lactobacillus* predominantes em gramíneas tropicais. In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** UFPB. João Pessoa. 2006.

SAVARIS, V. D. L.; POZZA, P. C.; NUNES, R. V.; POZZA, M. S. dos S.; OELKE, C. A.; CARNEIRO, A. P. de S. Perfil microbiológico e valores energéticos do milho e silagens de grãos úmidos de milho com adição de inoculantes para suínos. **Acta Sci. Anim. Sci.** Maringá, v. 29, n. 4, p. 403-409, 2007.

SCHINGOETHE, D. J.; SKYBERG, E. W.; ROOK, J. A. Chemical composition of sunflower silage as influenced by additions of urea, dried whey and sodium hydroxide. **Journal of Animal Science**, v.50, n.4, p.529-625, 1980.

SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F.; REIS, R. A. Instabilidade aeróbia de silagens: efeitos e possibilidades de prevenção. In: SIMPÓSIO SOBRE VOLUMOSOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES. Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 2005. p. 25-60.

SOUZA, B. P. S. Momento de colheita de quatro genótipos de girassol (*Helianthus annuus L.*). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 47p. **Dissertação...** (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

SOUZA, B. P. S.; COELHO, S. G.; GONÇALVES, L. C. Composição bromatológica da silagem de quatro genótipos de girassol ensilados em cinco diferentes idades de cortes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, supl.2, p.204-211, 2005.

SOUZA, L. O; SANTOS, E. M.; PENTEADO, D. C. S. Composição bromatológica de silagem de capim-mombaça inoculada com *Lacto-bacillus plantarum* da microbiota epifítica. IN: VI Congresso Nacional de Zootecnia-Zootec. **Anais...** UFRPE. Recife. 2006.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v.56, n.4, p.845-857, 2005.

TODOVORA, S; KOZHUHAROVA, L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul v.96, p.1151-1161, 2009.

TOMICH, T. R.; PEREIRA, L. G. R.; GONÇALVES, L. C. Alimentos Volumosos para o Período Seco - I: Silagem de Girassol. **Embrapa Pantanal**. Corumbá, p.30, 2004a.

TOMICH, T. R.; GONÇALVES, L. C.; TOMICH, R. G. P.; RODRIGUES, J. A. S.; BORGES, I.; RODRIGUEZ, N. M. Características químicas e digestibilidade *in vitro* de silagens de girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.33, n.6, p.1672-1682, 2004b.

VALDEZ, F. R.; HARRISON, J. H.; DEETZ, D. A. In vivo Digestibility of corn and sunflower intercropped as a silage crop. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.7, p.1860-1867, 1988a.

VALDEZ, F. R.; HARRISON, J. H.; FRASEN, S. C. Effect of feeding sunflower silage on milk production, milk composition, and rumen fermentation of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.9, p.2462-2469, 1988b.

VIANA, P. T.; PIRES, A. J. V.; OLIVEIRA, L. B. de; CARVALHO, G. G. P. de; RIBEIRO, L. S. O.; CHAGAS, D. M. T.; FILHO, C. S. N.; CARVALHO, A. O. Fracionamento de carboidratos e de proteína das silagens de diferentes forrageiras. **R. Bras. Zootec.**, v.41, n.2, p.292-297, 2012.

VILELA, D. Sistemas de conservação de forragem. Silagem. Coronel Pacheco: **EMBRAPA – CNPGL**, 1985. 42p. (Boletim de Pesquisa, 11).

VILELA, D. Aditivos para silagens de plantas de clima tropical. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES E NÃO RUMINANTES, 1., 1998, Botucatu, 35., REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. **Anais...** Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1998. p.73-108.

YILDIRIM, M. Purification of *buchnericin* LB produced by *Lactobacillus buchneri* LB. **Turkish Journal of Biology**, v.25, p.59-65, 2001.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. Departamento de Zootecnia, USP/ESALQ, Piracicaba/SP. **R. Bras. Zootec.**, v.38, p.170-189, 2009 (supl. especial).