

**ISOLAMENTO E USO DE *Lactobacillus buchneri*  
NA ENSILAGEM DE CAPIM-MOMBAÇA E  
CANA-DE-AÇÚCAR**

**CARLA LUIZA DA SILVA ÁVILA**

**2007**

**CARLA LUIZA DA SILVA ÁVILA**

**ISOLAMENTO E USO DE *Lactobacillus buchneri* NA ENSILAGEM DE  
CAPIM-MOMBAÇA E CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Forragicultura e Pastagem, para a obtenção do título de “Doutor”.

**Orientador**  
**Prof. José Cardoso Pinto**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**  
**2007**

**CARLA LUIZA DA SILVA ÁVILA**

**ISOLAMENTO E USO DE *Lactobacillus buchneri* NA ENSILAGEM DE  
CAPIM-MOMBAÇA E CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Forragicultura e Pastagem, para a obtenção do título de “Doutor”.

**APROVADA** em 09 de março de 2007

Prof. Augusto Ramalho de Moraes	DEX/UFLA-MG
Prof <sup>a</sup> Rosane Freitas Schwan	DBI/UFLA-MG
Prof. Henrique César Pereira Figueiredo	DMV/UFLA-MG
Prof. Odilon Gomes Pereira	DZO/UFV-MG

**Prof. José Cardoso Pinto**  
**UFLA**  
**(Orientador)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Ávila, Carla Luiza da Silva

Isolamento e uso de *Lactobacillus buchneri* na ensilagem de capim-mombaça e  
cana-de-açúcar / Carla Luiza da Silva Ávila. -- Lavras : UFLA, 2007.

175 p. : il.

Orientador: José Cardoso Pinto.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Silagem. 2. Inoculante. 3. Estabilidade aeróbia. 4. Microorganismo. 5.  
Fermentação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-636.08552

Às minhas filhas Ana Luiza e Carolina

**DEDICO**

Ao meu marido Luciano

Aos meus pais Lindeberg Naves da Silva e

Ana Luiza de Carvalho Silva

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS por ter me dado forças e saúde para vencer mais esta etapa;

À Universidade Federal de Lavras pela formação profissional;

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro;

Ao professor José Cardoso Pinto pela orientação, paciência, ensinamentos e exemplo de dedicação profissional;

À professora Rosane Freitas Schwan pelas orientações, por permitir que o trabalho fosse conduzido no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia, mas principalmente pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores Henrique César Pereira Figueiredo e Augusto Ramalho de Moraes, pelas valiosas sugestões durante todo o desenvolvimento do trabalho, atenção e amizade;

Ao professor Odilon Gomes Pereira, pelas sugestões que contribuíram grandemente para o aprimoramento do trabalho;

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa Animal, Márcio, Suelba, José Virgílio e Eliana pela grande ajuda na realização das análises laboratoriais;

Aos secretários da Pós-graduação Keila, Carlos e Pedro;

Aos funcionários e amigos do Departamento de Biologia, Ivani, Magda e Cidinha pela amizade, e colaboração sempre que foi preciso;

A todos os professores, colegas de pós-graduação, alunos de iniciação científica e estagiários do curso de Microbiologia Agrícola, com os quais eu convivi durante todo o tempo de condução do experimento, em um ambiente onde a amizade e a solidariedade foi de fundamental importância para o sucesso do trabalho;

A todos os funcionários do Departamento de Zootecnia pelo auxílio no momento da ensilagem;

A todos os colegas de pós graduação principalmente aos amigos Alexandre Rocha Valeriano e Valdir Botega Tavares pela importante ajuda na condução de todo o experimento;

Aos bolsistas de Iniciação Científica Michele Símile da Silva, Myuki Sugawara e Damyane pela amizade e pela imprescindível ajuda durante a condução do experimento e das análises laboratoriais;

A toda a minha família e em especial à Elaine Avelar Moraes, pelo carinho que sempre teve com minhas filhas;

A todos os amigos, desde os de infância até os mais recentes, que sempre torceram por mim e que de alguma forma contribuíram para a condução deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	i
RESUMO .....	ii
ABSTRACT .....	iv
CAPÍTULO 1 .....	
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 O processo de ensilagem .....	3
2.2 A microbiota da silagem .....	3
2.2.1 Microbiota epifítica .....	4
2.2.2 Microrganismos desejáveis .....	5
2.2.2.1 Bactérias ácido lácticas (BAL) .....	5
2.2.2.2 Principais vias de fermentação .....	6
2.2.3 Microrganismos indesejáveis .....	8
2.2.3.1 Clostrídeos .....	8
2.2.3.2 Enterobacteriáceas .....	9
2.2.3.3 Listéria .....	11
2.2.3.4 Bacilos .....	11
2.2.3.5 Fungos filamentosos e leveduras .....	12
2.3 Uso de inoculantes no processo de ensilagem .....	14
2.4 Inibição da deterioração aeróbica da silagem .....	18
2.6 A espécie <i>Lactobacillus buchneri</i> e sua ação sobre a estabilidade aeróbia das silagens .....	21
CAPÍTULO 2 Isolamento e identificação de bactérias lácticas heterofermentativas .....	29
1 INTRODUÇÃO .....	32
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
2.1 Amostragem e contagem do número de bactérias do ácido láctico .....	35



2.2 Isolamento e identificação dos microrganismos .....	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
3.1 Testes bioquímicos para identificação das espécies de bactérias.....	38
4. CONCLUSÕES.....	41
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
CAPÍTULO 3 Perfil de fermentação e estabilidade aeróbia das silagens de capim-mombaça tratadas com <i>L. buchneri</i> .....	45
1 INTRODUÇÃO .....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	51
2.1 Local e período.....	51
2.2 Delineamento Experimental e Tratamentos .....	51
2.4 Preparo dos inoculantes.....	53
2.5 Preparo das silagens e formação dos tratamentos .....	54
2.6 Avaliação do perfil de fermentação das silagens .....	55
2.7 Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens.....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
3.1 Composição química da forragem do capim-mombaça antes da ensilagem.....	60
3.2 Composição química das silagens do capim-mombaça com a fermentação .....	61
3.3 Avaliação da população de BAL, levedura e fungos filamentosos....	71
3.4 Produção de ácidos graxos voláteis e ácido láctico .....	77
3.5 Estabilidade aeróbia das silagens de capim-mombaça.....	83
3.5.1 Avaliação das populações de BAL, leveduras e fungos filamentosos .....	83
3.5.2 Produção de ácidos graxos voláteis e ácido láctico .....	86
3.5.3 Estabilidade aeróbia com base na temperatura.....	91
3.4 Variações na composição química das silagens durante a fase aeróbica .....	94
4. CONCLUSÕES.....	98

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99
CAPÍTULO 4 Perfil de fermentação e estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar tratadas com <i>L. buchneri</i> .....	103
1 INTRODUÇÃO .....	106
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	110
2.1 Local e Período.....	110
2.2 Delineamento Experimental e Tratamentos .....	110
2.3 Preparo da forragem para ensilagem .....	112
2.4 Preparo dos inoculantes.....	112
2.5 Preparo das silagens e formação dos tratamentos .....	113
2.6 Avaliação do perfil de fermentação das silagens .....	114
2.7 Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens.....	117
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	119
3.1 Composição química da forragem de cana-de-açúcar antes da ensilagem.....	119
3.2 Variações na composição química das silagens de cana-de-açúcar com a fermentação .....	120
3.3 Avaliação da população de BAL, levedura e fungo filamentosos .....	133
3.4 Produção de ácidos graxos voláteis, ácido láctico e etanol.....	138
3.5 Estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar .....	145
3.5.1 Avaliação das populações de BAL, leveduras e fungos filamentosos .....	145
3.5.2 Produção de ácidos graxos voláteis, ácido láctico e etanol.....	148
3.5.3 Estabilidade aeróbia com base nos valores de temperatura .....	150
3.5.4 Variações na composição química durante a fase aeróbica .....	154
4. CONCLUSÕES.....	160
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	161
ANEXOS.....	166

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGV: Ácidos graxos voláteis.

BAL: Bactérias do ácido lático.

CHOs: Carboidratos solúveis.

CV: Coeficiente de variação.

CF: Coeficiente de fermentação.

DIVMS: Digestibilidade *in vitro* da MS.

FDA: Fibra em detergente ácido.

FDN: Fibra em detergente neutro.

FF: Fungo filamentosos.

FV: Fontes de de variação.

GL: Graus de liberdade.

HEM: Hemicelulose.

LEV: Levedura.

MS: Matéria seca.

MV: Matéria verde.

NH<sub>3</sub>: Teor de nitrogênio amoniacal como porcentagem do nitrogênio total.

PB: Proteína bruta.

QM: Quadrado médio.

ufc: Unidades formadoras de colônia.

## RESUMO

ÁVILA, Carla Luiza da Silva. **Isolamento e uso de *Lactobacillus buchneri* na ensilagem de capim-mombaça e cana-de-açúcar**. 2007. 175p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. \*

Este trabalho teve como objetivo isolar uma cepa de *Lactobacillus buchneri* em silagens de cana-de-açúcar para uso na ensilagem de forrageiras tropicais. Além disso, pretendeu-se avaliar a influência da espécie *Lactobacillus buchneri* sobre o perfil químico e microbiológico e sobre a estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e capim-mombaça (*Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça) e, por fim, verificar se existem diferenças entre inoculantes contendo cepas bacterianas isoladas de espécies forrageiras diferentes e sob condições climáticas distintas. Para isolamento de *L. buchneri*, foram coletadas 80 g de amostras de silagem de cana pura aos 5, 20, 40 e 80 dias de fermentação, misturadas com 720 ml de água peptonada estéril e agitadas durante 20 minutos. A partir do extrato obtido, foram preparadas diluições decimais de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  e plaqueamento em meio MRS. As placas foram incubadas a 30°C por 24-48 horas. Após esse período foi escolhida, para morfologia de colônia, uma placa e diluição cuja contagem esteve entre 30 e 300 colônias. Os isolados selecionados foram purificados e submetidos aos testes específicos coloração de gram, catalase, motilidade e produção de gás a partir da glicose para classificação das mesmas quanto ao gênero. Para identificação das espécies foi utilizado o sistema API (BioMerieux, Marcy l'Étoile, France). Ao final, foram obtidos 72 isolados, todos classificados como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Destes, apenas 13 (18%) produziram gás e foram identificados. Nos isolados identificados foram encontradas 3 espécies diferentes, *L. plantarum* (1 isolado), *L. buchneri* (2 isolados) e *L. brevis* (8 isolados), e 2 cepas não foram identificadas. Com isso, sugere-se que a espécie *L. brevis* é a bactéria heterofermentativa dominante durante a fermentação da silagem de cana-de-açúcar. Os experimentos para avaliação do perfil de fermentação foram conduzidos em um delineamento inteiramente casualizado, com três silagens (sem inoculante e com inoculantes experimental e comercial) e seis tempos de abertura dos silos (0, 3, 10, 30, 60 e 90 dias). Para avaliação da estabilidade aeróbia utilizou-se, também, um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, com parcelas subdivididas no tempo, em um esquema do tipo 6 x 4, ou seja, três silagens

---

\* **Comitê de Orientação:** José Cardoso Pinto – UFLA/DZO (Orientador); Rosane Freitas Schwan – UFLA/DBI; Augusto Ramalho de Moraes – UFLA/DEX; Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA/DMV.

(silagens sem inoculantes e com inoculante experimental e comercial) e quatro tempos de avaliação aeróbica das silagens (0, 2, 8, e 10 dias para o capim-mombaça e 0, 2, 4 e 6 dias para cana-de-açúcar). Após um período de ensilagem de 90 dias, os silos foram abertos e destes foram retiradas amostras de cerca de 3,0 kg para avaliação da estabilidade aeróbica com base na temperatura e nas modificações químicas e microbiológicas ocorridas. Para as duas espécies estudadas, a adição dos inoculantes influenciou as modificações na composição química das silagens ao longo do processo, sendo que, quando houve interação entre os fatores, as silagens inoculadas apresentaram perfil semelhante, porém diferente da testemunha. Ao final do processo, a composição química de todas as silagens foi semelhante. Em ambas também ocorreu intensa utilização dos carboidratos solúveis nos primeiros 15 dias de fermentação; no entanto, as silagens de cana-de-açúcar apresentaram menor pH e nitrogênio amoniacal e maior concentração de ácidos graxos voláteis e ácido láctico. Nas silagens de capim-mombaça, os dois inoculantes inibiram crescimento de leveduras e fungos filamentosos, porém o inoculante comercial foi mais eficiente. Nas silagens de cana, a população de fungos filamentosos esteve abaixo do nível detectável (2,0 log ufc/g) e a de BAL foi alta, mas a de leveduras foi intensamente inibida pelos inoculantes em função da mais alta concentração de ácido acético e propiônico, resultando também em menor produção de etanol nas silagens inoculadas. Para as duas espécies, assim que os silos foram abertos foram verificadas modificações nas silagens, com aumento nas populações de microrganismos, resultando em redução da concentração de ácidos orgânicos e aumento dos valores de pH. A adição de *L. buchneri* melhorou a estabilidade aeróbia tanto nas silagens de capim-mombaça quanto nas de cana-de-açúcar. Todavia, seu efeito foi mais pronunciado nas silagens de cana por causa da maior inibição de leveduras em comparação com a silagem sem inoculante.

## ABSTRACT

ÁVILA, Carla Luiza da Silva. **Isolation and use of *Lactobacillus buchneri* in the ensiling of Mombaça grass and sugar cane**. 2007. 175p. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Federal University of Lavras, Lavras.\*

It was aimed by this work to isolate a strain of *Lactobacillus buchneri* in sugar cane silages for use in the ensiling of tropical forage plants. In addition, it was aimed to evaluate the influence of the species *Lactobacillus buchneri* on the chemical and microbiologic profile and on the aerobic stability of the silages of sugar cane (*Saccharum* spp.) and Mombaça grass (*Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça). At last, to verify if there are differences among inoculants containing bacterial strains isolated from different forage species and under distinct climatic conditions. For isolation of *L. buchneri*, 80 g of samples of plain sugar cane silage at 5, 20, 40 and 80 days old of fermentation mixed with 720 ml of sterile peptonized water and shaken for 20 minutes were collected. From the obtained extract, decimal dilutions of  $10^{-1}$  to  $10^{-6}$  and plating in MRS medium were prepared. The dishes were incubated at 30°C for 24-48 hours. After that period, for colony morphology, a dish and dilution that count of which was between 30 and 300 colonies was chosen. The selected isolates were purified and submitted to the specific tests: gram coloration, catalysis, motility and gas production from the glucose for classification of them at the genus level. For the identification of the species, the API system (BioMerieux, Marcy l'Étoile, France) was employed. At the end, 72 isolates were obtained, all of them being classified as belonging to the genus *Lactobacillus*. Out of these, only 13 (18%) produced gas and were identified. In the identified isolates were found 3 different species, *L. plantarum* (1 isolate), *L. buchneri* (2 isolates) and *L. brevis* (8 isolates) and 2 strains were not identified. From this, it is suggested that the species *L. brevis* is the dominant heterofermentative bacterium during fermentation of sugar cane silage. The experiments for evaluating the fermentation profile were conducted in a completely randomized design with three silages (without inoculant and with experimental and commercial inoculants) and six times of opening of the silos (0, 3, 10, 30, 60 and 90 days). For evaluation of the aerobic stability, a completely randomized design with three replicates with splitplots in time in a scheme of the 6 x 4 type, namely, three silages (silages without inoculant and with experimental and commercial

---

\* Guidance Committee: José Cardoso Pinto – UFLA/DZO (Adviser); Rosane Freitas Schwan – UFLA/DBI; Augusto Ramalho de Moraes – UFLA/DEX; Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA/DMV.

inoculants) and four aerobic evaluation times of the silages (0, 2, 8 and 10 days for Mombaça grass and 0, 2, 4 and 6 days for sugar cane). After an ensiling period of 90 days, the silos were opened and from these were removed samples of about 3.0 kg for evaluation of the aerobic stability on the basis of temperature and chemical and microbiological modifications occurred. For the two species studied, the addition of inoculants influenced the modifications in the chemical composition of the silages along the process, where there was an interaction among the factors, the inoculated silages presented a similar profile but different from the control. At the end of the process, the chemical composition of all the silages was similar. In both, an intense utilization of the soluble carbohydrates also occurred in the first 15 days' fermentation, nevertheless, the sugar cane silages presented lower pH, ammonium nitrogen and greater concentration of volatile fatty acids and lactic acid. In the Mombaça grass silages, the two inoculants inhibited the growth of yeasts and filamentous fungi, but the commercial inoculant was more efficient. In the sugar cane silages, the population of filamentous fungi was below the detectable level (2.0 log cfu/g) and the one of LAB was high but that of yeasts was markedly inhibited by the inoculants as related with the highest concentration of acetic and propionic acids, resulting also into less production of ethanol in the inoculated silages. For the two species, as soon as the silos were opened, modifications in the silages were found with the increase in the populations of microorganisms resulting into reduced concentration of organic acids and increase of the pH values. The addition of *L. buchneri* improved the aerobic stability both for the Mombaça grass and sugar cane silages. Nevertheless, its effect was more marked in the sugar cane silages because of the higher inhibition of yeasts as compared with the silage without any inoculants.

## **CAPÍTULO 1**



## **1 INTRODUÇÃO GERAL**

O Brasil se destaca como uma das principais nações para a pecuária como reflexo, principalmente, da sua grande extensão territorial e do clima tropical. Porém, na maior parte do território brasileiro o clima é caracterizado por duas estações bem definidas, ou seja, uma estação seca e fria e uma estação quente e chuvosa. Isso faz com que exista uma grande estacionalidade de produção de forragem ao longo do ano, com somente 10 a 20% da produção na época seca. Assim, a conservação de parte e/ou do excedente da forragem produzida na época das chuvas sob a forma de silagem torna-se de fundamental importância para a pecuária brasileira.

A ensilagem é um processo de conservação no qual se pretende manter a forragem com valor nutricional o mais próximo possível do valor original, evitando perdas e mantendo a qualidade sanitária do alimento. Para tanto, deve-se ter amplo conhecimento sobre o processo de fermentação, fornecendo condições para o desenvolvimento dos microrganismos desejáveis para que se possa fornecer alimento de boa qualidade aos animais, mantendo os melhores índices produtivo e reprodutivo do rebanho.

Muito se tem feito com o intuito de melhorar o processo de fermentação das forragens; no entanto, forragens bem preservadas têm apresentado problemas de deterioração aeróbia em decorrência da entrada de ar no silo durante a fermentação e no momento de fornecer aos animais. Neste contexto, nos últimos anos tem havido uma preocupação crescente em melhorar a estabilidade aeróbia das silagens.

A maioria dos inoculantes bacterianos para silagem existentes no mercado contém uma ou mais espécies de bactérias ácido lácticas (BAL) homofermentativas, que são mais rápidas e eficientes produtoras de ácido lático.

Todavia, alguns estudos têm mostrado que o excesso de BAL homofermentativas pode piorar a estabilidade aeróbia das silagens por causa da menor concentração de ácido acético, que é um ácido mais eficiente em inibir o crescimento de fungos. Recentes estudos têm mostrado que a adição de inoculantes contendo cepas da bactéria heterofermentativa *Lactobacillus buchneri* à silagem pode inibir o crescimento de leveduras e melhorar a estabilidade aeróbia das silagens em razão do aumento na concentração do ácido acético. Porém, no Brasil, são raros os trabalhos estudando o influência da adição desse microrganismo sobre a microbiota das silagens e, portanto, sobre as suas características de fermentação e de deterioração aeróbia.

A baixa estabilidade aeróbia das silagens é um problema ao qual se deve dar maior importância, já que representa perdas de forragem e, portanto, aumento nos custos de produção das mesmas.

Este trabalho teve como objetivo principal verificar o efeito da adição de inoculantes contendo a espécie *Lactobacillus buchneri* na estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e capim-mombaça (*Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça).

Além disso, pretendeu-se:

Isolar uma cepa de *Lactobacillus buchneri* em silagens de cana-de-açúcar para uso na ensilagem de forrageiras tropicais;

Verificar se existem diferenças entre inoculantes contendo cepas bacterianas isoladas de espécies forrageiras diferentes e sob condições climáticas distintas;

Avaliar a influência da espécie *Lactobacillus buchneri* sobre o perfil químico e microbiológico das silagens estudadas.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 O processo de ensilagem**

Silagem é o produto formado quando gramíneas ou outros vegetais com teor de umidade suficientemente alto [como, por exemplo, leguminosas ou milho forrageiro (*Zea mays* L.)] sujeitos a deterioração por microrganismos aeróbios são estocados anaerobicamente. A silagem é produzida através do processo da ensilagem, no qual a forragem passa por uma fermentação ácida em que as bactérias produzem os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico utilizando açúcares presentes no material original. O objetivo final é reduzir o pH, inibindo o crescimento de microrganismos deterioradores que são intolerantes às condições ácidas (Woolford, 1984).

O processo da ensilagem deve ser considerado um processo de fermentação industrial como outro qualquer. Desta forma, as plantas forrageiras devem ser vistas como meio de cultura, contendo todos os nutrientes necessários aos microrganismos de interesse, que são BAL. Cuidados com a assepsia também são de importância fundamental no processo da ensilagem para reduzir a contaminação com clostrídeos e outros microrganismos indesejáveis. E, por fim, o ambiente deve ser mantido anaeróbio, evitando, assim, o crescimento de microrganismos de deterioração aeróbia.

### **2.2 A microbiota da silagem**

A microbiota da silagem pode ser dividida, basicamente, em dois grupos, que são os microrganismos desejáveis e os indesejáveis. Os microrganismos desejáveis são, sobretudo, as bactérias do ácido láctico (BAL), que fazem parte da microbiota epifítica da planta ou são adicionadas à silagem por meio de

inoculantes. Os indesejáveis são os microrganismos que podem causar deterioração anaeróbica (como clostrídeos) ou deterioração aeróbica (como leveduras, bacilos, listéria e mofos). Esses microrganismos podem estar presentes na cultura ou serem oriundos da contaminação, principalmente do solo, competindo com as BAL por carboidratos solúveis e seus produtos finais; em geral eles não têm influência na preservação (McDonald et al., 1991).

### **2.2.1 Microbiota epifítica**

Microbiota epifítica é a população de microrganismos presentes na forragem fresca. Essa população é muito variável e é afetada por características da espécie forrageira, incluindo teor de açúcares, teor de matéria seca (MS), composição do açúcar, estágio de maturidade e outras características como clima, corte, secagem a campo e processo de picagem. Essas características, associadas a outras propriedades das BAL como tolerância à acidez, à pressão osmótica e utilização do substrato, irão influenciar na competitividade das BAL durante o processo de fermentação (Bolsen, 1995).

As BAL fazem parte da microbiota presente no material vegetal. Essa população em geral é inicialmente baixa, aumentando substancialmente entre a colheita e a ensilagem. Whiter & Kung Jr. (2001) efetuaram contagens de BAL na forragem de 5,04 a 5,41 log da ufc/g de forragem e, com dois dias de ensilagem, esse número aumentou para aproximadamente 9,0 log da ufc/g de forragem, sem adição de inoculantes. Cai et al. (1999) efetuaram contagens, na base da matéria fresca, de aproximadamente 3 log da ufc/g de forragem de bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Clostridium*; de 3 a 5 log da ufc/g de bactérias dos gêneros *Enterococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella*; de 3 a 4 log da ufc/g de fungos filamentosos; de 4 a 5 log da ufc/g de leveduras e de 5 a 6 log da ufc/g de bactérias aeróbias em três forrageiras, alfafa (*Medicago sativa*

L.), sorgo (*Sorghum* spp. ) e (*Lolium multiflorum* Lam.) azevém anual *Italian ryegrass*. Em geral, o processo de picagem tende a aumentar o número de microrganismos comparado com a cultura no campo. No entanto, esse aumento provavelmente decorre da quebra de dormência das células, e não da eventual inoculação da máquina colheitadeira (Bolsen, 1995; Oude Elferink et al., 2000). Ao contrário das BAL, as populações de bactérias aeróbias e fungos filamentosos tendem a diminuir com o estabelecimento das condições anaeróbicas e abaixamento do pH dentro do silo.

## **2.2.2 Microrganismos desejáveis**

### **2.2.2.1 Bactérias ácido lácticas (BAL)**

É o principal grupo de microrganismos que atua no processo fermentativo para conservação da massa ensilada. Dentre as BAL, as mais importantes envolvidas com o processo de fermentação da silagem são as dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*. Segundo Hammes et al. (1992), na silagem ocorre uma sucessão de espécies diferentes de BAL. No estágio inicial, as bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* dominam o processo, seguidas por *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são mais resistentes às condições ácidas.

A principal característica desse grupo é que essas bactérias produzem ácido láctico como principal, ou único, produto do seu metabolismo. São bactérias gram positivas, usualmente não móveis e não esporulantes. Os membros desse grupo não possuem porfirinas nem citocromos, não possuem cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, obtêm energia somente por fosforilação ao nível do substrato (Hammes et al., 1992). Todas as BAL são microaerofílicas, mas algumas têm preferência por condições anaeróbicas. (Devriese et al., 1992; Hammes et al., 1992; Holzapfel & Schillinger 1992).

### **2.2.2.2 Principais vias de fermentação**

A maioria das BAL obtém energia somente do metabolismo de açúcares (hexoses e pentoses) e compostos fermentáveis relacionados e, conseqüentemente, são usualmente restritas aos habitats em que açúcares estão presentes (Madigan et al., 1997).

As duas vias principais de utilização de açúcares pelas BAL são a glicólise ou via de Embden-Meyerhof Parnas (EMP) e a Via das Pentoses Fosfato. A glicólise ou via EMP é caracterizada pela formação de frutose-1,6-difosfato (FDP), a qual é dividida por uma FDP aldolase em dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP). Estes dois açúcares de três carbonos são, então, convertidos a piruvato em uma seqüência metabólica incluindo fosforilação ao nível do substrato (Madigan et al., 1997).

Sob condições normais (excesso de açúcar e acesso limitado ao oxigênio), o piruvato é reduzido a ácido láctico por uma lactato desidrogenase (LDH) dependente de  $\text{NAD}^+$ , reoxidando o NADH formado durante os primeiros passos da glicólise e obtendo, assim, um balanço redox. Ao final da reação, há um ganho líquido de 2 ATP por molécula de glicose fermentada. Essa via é usada pelas BAL, com exceção dos leuconostocs e de alguns lactobacilos, sendo o ácido láctico o principal produto formado. Esse metabolismo é chamado de fermentação homolática (Axelsson, 1998; Madigan et al., 1997).

A outra via de fermentação utilizada pelas bactérias do ácido láctico pode ter várias designações, Via Pentose Fosfato, Via Fosfoquetolase ou Hexose Monofosfato e, por último, via 6-fosfogluconato. Essa via é caracterizada pela desidrogenação inicial da glicose com a formação de 6-fosfogluconato, seguida pela descarboxilação. A pentose-5-fosfato formada posteriormente é, então, dividida por uma fosfoquetolase em gliceraldeído fosfato (GAP) e acetil fosfato.

A GAP é metabolizada pela via glicolítica da mesma forma como mostrada anteriormente, resultando na formação de ácido láctico. Quando nenhum aceptor de elétrons está disponível, o acetil fosfato é reduzido a etanol via acetil-Coa e acetaldeído. Esse metabolismo resulta em quantidades significativas de outros produtos como CO<sub>2</sub> e etanol, em adição ao ácido láctico, sendo referido como fermentação heterolática (Axelsson, 1998).

Com relação ao padrão de fermentação de açúcares, as BAL podem ser divididas em três categorias: homofermentativas, heterofermentativas facultativas e heterofermentativas obrigatórias. As heterofermentativas obrigatórias não possuem a enzima aldolase, não podendo quebrar a frutose bifosfato em triose fosfato. Ao contrário, essas bactérias oxidam glicose 6-fosfato a 6- fosfogluconato e, depois, descarboxila este a pentose fosfato e acetilfosfato por meio da enzima fosfoquetolase (Hammes et al., 1992).

As BAL heterofermentativas facultativas assemelham-se às BAL homofermentativas pelo fato de possuírem a enzima FDP aldolase constitutiva, resultando no uso da glicólise para fermentação de hexoses. No entanto, as pentoses induzem a síntese de fosfoquetolase, resultando em uma fermentação heterolática (Axelsson, 1998).

Deve-se ter o cuidado ao associar fermentação homolática ou heterolática com a via metabólica utilizada pois a glicólise pode levar a uma fermentação heterolática, ou seja, produzir quantidades significativas de outros produtos além do ácido láctico, sob certas condições. Também, deve ser notado que as BAL consideradas homofermentativas utilizam a via pentose fosfato quando metabolizam certos substratos (Axelsson, 1998).

## **2.2.3 Microrganismos indesejáveis**

### **2.2.3.1 Clostrídeos**

Clostrídeos são bactérias anaeróbicas formadoras de endósporos, podendo ter um pronunciado efeito sobre a qualidade da silagem (Bolsen, 1995). Essas bactérias podem causar fermentação secundária, que converte ácido láctico a ácido butírico, e degradam aminoácidos a aminas e amônia. Como resultado, a silagem é caracterizada pelo alto conteúdo de ácido butírico, mais que 5 g/kg de MS, alto pH (superior a 5 em silagens com baixo teor de MS) e altas concentrações de amônia e amina (Oude Elferink et al., 2000).

Os clostrídeos normalmente não são ativos na presença de oxigênio e requerem condições úmidas para crescer, sendo crescimento clostrídeo raro em culturas ensiladas com menos de 65% de umidade. Isto porque os clostrídeos são mais susceptíveis à baixa disponibilidade da água (ou atividade da água,  $a_w$ ) do que as BAL (McDonald et al., 1991). Geralmente afetam a silagem após as BAL terem usado os açúcares na forragem ensilada, mas o pH ainda não é baixo o suficiente para inibir sua atividade (Lythe & Russel, 2004).

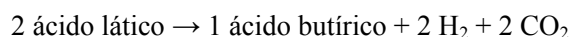
Os clostrídeos podem ser divididos em dois grupos: 1) aqueles que fermentam açúcares e ácidos orgânicos (como o ácido láctico); e 2) aqueles que fermentam aminoácidos livres. Ambos os grupos afetam a qualidade da silagem negativamente. Quando clostrídeos fermentam aminoácidos, elevam-se a produção da amônia e os valores de pH e, assim, outros produtos indesejáveis podem acumular. Essas fermentações podem resultar em altas ou baixas perdas de MS; no entanto, o mais significativo efeito desses clostrídeos é a produção de aminas, que são conhecidas por diminuir o consumo das silagens (Bolsen, 1995).

Devido ao fato de os esporos de clostrídeos poderem sobreviver à passagem através do trato digestivo de vacas leiteiras, estes podem ser



transferidos da silagem para o leite via fezes ou contaminação fecal pelo úbere. Assim, os prejuízos da fermentação clostrideal nas silagens vão além da qualidade nutricional da mesma, prejudicando a qualidade do leite e seus derivados. Clostrídeos formam esporos, que constituem um importante critério de qualidade higiênica de silagens com relação à produção de leite, cuja classificação pode ser adequado ou não à produção de queijos (Danner et al., 2003).

A espécie *Clostridium tyrobutyricum* é a mais importante espécie para a indústria leiteira. Além da fermentação de carboidratos, estes microrganismos degradam ácido láctico a ácido butírico, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> de acordo com a seguinte reação:



Essa fermentação butírica não somente degrada o ácido láctico na fermentação da silagem, mas também é responsável por significativa produção de gás, causando um defeito chamado “estufamento tardio” em alguns queijos como Emental, Grana, Gouda e Parmesão (Oude Elferink et al., 2000).

Os métodos de ensilagem que causam rápida e suficiente queda no pH da silagem ajudarão na prevenção do desenvolvimento de esporos clostrideais, já que estes são sensíveis ao baixo pH (Bolsen, 1995; McDonald et al, 1991).

### **2.2.3.2 Enterobacteriáceas**

As enterobactérias são bacilos Gram-negativos e anaeróbios facultativos; a maioria é não patogênica, porém existe um número considerável de patógenos que podem ser prejudiciais a homens, animais e plantas (Jobim & Gonçalves, 2003).

Essas bactérias competem com as BAL ácido lácticas pelos açúcares no início do processo de fermentação da massa ensilada. Elas também fermentam

açúcares e produzem ácido láctico, acético e etanol como as BAL, mas o principal produto é o ácido acético, que reduz a taxa de declínio do pH no material ensilado e aumenta as perdas de MS seca durante a fase de fermentação e são capazes de degradar proteínas. Esta degradação de proteínas não somente causa redução do valor nutritivo, mas também resulta na produção de compostos tóxicos como aminas biogênicas e ácidos graxos ramificados. As aminas biogênicas têm efeito negativo sobre a aceitabilidade, especialmente de animais que não estão habituados com o sabor. Além disso, a amônia formada através da proteólise aumenta a capacidade tampão da cultura ensilada, impedindo uma rápida queda do pH (Oude Elferink et al., 2000).

As enterobactérias incluem um grande número de gêneros, entre os quais citam-se *Escherichia*, *Klebsiela* e *Erwinia*. A presença destas bactérias pode ser minimizadas pela rápida fermentação por BAL porque o pH ótimo para seu crescimento é de 6,0 a 7,0 e a maioria das cepas de Enterobacteriáceas não cresce em pH abaixo de 5,0. Conseqüentemente, a população de enterobactérias que é usualmente alta na cultura ensilada é ativa somente nas primeiras 12 a 24 horas de ensilagem (Bolsen, 1995).

Outra característica importante das enterobactérias é que elas também são capazes de reduzir nitrato ( $\text{NO}_3$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2$ ) sob condições de ensilagem. Na silagem, o nitrito pode ser degradado por enterobactérias a amônia e óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), mas também pode ser degradado quimicamente a NO e nitrato. Com o ar, NO é oxidado a uma mistura de gases ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$  e  $\text{N}_2\text{O}_4$ ). Os gases NO e  $\text{NO}_2$  têm um efeito danoso sobre os tecidos do pulmão. No entanto, uma pequena redução do nitrito é considerada positiva para a qualidade da silagem porque estes dois compostos são inibidores efetivos de clostrídeos (Oude Elferink et al., 2000).

### **2.2.3.3 Listéria**

As bactérias do gênero *Listeria* são aeróbios ou anaeróbios facultativos. Com relação à qualidade da silagem, a espécie *L. monocytogenes*, que é anaeróbica facultativa, é uma das espécies mais importantes no processo da ensilagem por ser patogênica a vários animais e ao homem. Animais com sistema imunológico enfraquecido (como fêmeas gestantes ou recém-nascidos) são mais susceptíveis a infecções causadas por *L. monocytogenes* (Bolsen, 1995). Silagens de qualidade ruim têm sido associadas como uma das principais fontes de contaminação de leite puro por *L. monocytogenes* (Schocken-Iturrino et al., 2005).

O crescimento e a sobrevivência de *Listeria* spp. na silagem são determinados pelo grau de anaerobiose e o pH da mesma. Essas bactérias toleram pH tão baixo quanto as BAL, podendo tolerar valores entre 3,8 e 4,2 por longos períodos se o oxigênio estiver presente, mesmo que em baixos níveis. Ao contrário, sob condições estritamente anaeróbicas e a baixos valores de pH, essas bactérias perdem rapidamente a viabilidade. Assim, essas bactérias estão envolvidas com deterioração aeróbica das silagens, não se desenvolvendo em silagens bem preservadas (Oude Elferink et al., 2001).

### **2.2.3.4 Bacilos**

Como os clostrídeos, os bacilos são bactérias formadoras de endosporos, podendo ser facilmente distinguidos dos clostrídeos por serem aeróbicos facultativos, enquanto todos os clostrídeos são anaeróbios obrigatórios. Os bacilos aeróbicos facultativos fermentam uma grande variedade de carboidratos a compostos como ácidos orgânicos (acetato, lactato e butirato) ou etanol, 2,3-butanodiol e glicerol. Algumas espécies de bacilos são capazes de produzir substâncias antifúngais, que têm sido utilizadas para inibir a deterioração

aeróbica da silagem. Exceto para estas cepas específicas, a ploriferação de bacilos na silagem é indesejável, não somente porque são menos eficientes produtores de ácido láctico e acético do que as BAL, mas porque aumentam a deterioração aeróbica da silagem nos últimos estádios (Oude Elferink et al., 2001). As espécies usualmente isoladas de silagem incluem *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis* e *B. polymyxa* (Giffel et al., 2002).

Tem sido observado que esporos de bacilos, da mesma forma como esporos de clostrídeos na silagem, não são afetados pela passagem pelo trato gastrointestinal de vacas e são excretados nas fezes. O leite pode, então, ser contaminado principalmente pelas fezes ou úbere. Conseqüentemente, esses esporos presentes no leite podem sobreviver ao processamento e, após germinação e crescimento a altos níveis, causar deterioração do alimento (McDonald et al., 1991)

Esporos de *Bacillus cereus* psicotróficos são considerados um dos mais importantes microrganismos deterioradores de leite pasteurizado e derivados do leite. A espécie *B. sporothermodurans* é um microrganismo formador de esporos muito resistentes ao calor, causando problema em leite UHT. Alto número dessas espécies de bacilos tem sido encontrado em silagens deterioradas (Giffel et al., 2002).

#### **2.2.3.5 Fungos filamentosos e leveduras**

Ensilagem de culturas forrageiras com alto teor de MS, compactação inadequada e baixas taxas de fermentação são fatores que favorecem o surgimento de leveduras e fungos filamentosos no silo. Isso ocorre porque esses fatores permitem a entrada de ar, possibilitando, assim, o desenvolvimento desses microrganismos e, conseqüentemente, reduzindo a aceitabilidade e contaminando a silagem com micotoxinas (Bolsen, 1995).

Os principais gêneros de fungos que geralmente têm sido isolados de silagem são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Absidea*, *Monoascus*, *Scopulariopsis* e *Trichoderma* (El-Shanawany et al., 2005; Santos et al., 2002). Os fungos são microrganismos aeróbicos, não crescendo bem em pH baixo, sendo o seu crescimento limitado durante o processo de fermentação (McDonald et al., 1991).

A presença de fungos é prejudicial à silagem porque eles quebram o açúcar e o ácido láctico pela via normal da respiração, mas também porque hidrolizam e metabolizam a celulose e outros componentes da parede celular. Além disso, alguns bolores, principalmente as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, crescem em silagens em que há penetração de ar e produzem toxinas que são prejudiciais aos animais e ao homem (Golieb, 1997).

As micotoxinas são produtos secundários altamente tóxicos do metabolismo de fungos, principalmente entre os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, entre outros. Existe, ainda, uma incerteza sobre as condições em que as micotoxinas são formadas na silagem. Uma infestação pesada não necessariamente contém alta quantidade e qualidade de micotoxinas. Uma vez formadas, as micotoxinas são estáveis e podem permanecer no alimento por muito tempo após o fungo ter morrido (El-Shanawany et al., 2005).

As leveduras são microrganismos eucarióticos, anaeróbicos facultativos e heterotróficos (McDonald et al., 1991). Como as leveduras podem crescer em condições anaeróbicas, podem manter altas populações nessas condições pela fermentação alcoólica de açúcares ( $1 \text{ glicose} \rightarrow 2 \text{ etanol} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Jobim & Gonçalves, 2003).

Em silagens, tanto a atividade aeróbica quanto a anaeróbica são consideradas indesejáveis. Sob as condições anaeróbicas de silagens as leveduras fermentam açúcares a etanol e  $\text{CO}_2$ . Esse etanol produzido não somente diminui a quantidade de açúcar disponível para as BAL, mas também

tem um efeito negativo sobre o sabor do leite. Sob condições aeróbicas, muitas espécies de leveduras degradam o ácido láctico, causando um aumento do pH da silagem e promovendo, assim, condições para que outros microrganismos deterioradores se desenvolvam (McDonald et al., 1991).

Segundo Oude Elferink et al. (2000), as populações de leveduras na silagem podem alcançar valores de de  $10^8$  ufc/g durante os primeiras semanas de ensilagem, sendo que esses números vão decrescendo sob condições prolongadas de estocagem. Os principais fatores que influenciam a sobrevivência de leveduras durante a estocagem são o grau de anaerobiose e a concentração de ácidos orgânicos. O oxigênio aumenta o número de leveduras, enquanto altos níveis de ácido fórmico ou acético reduzem sua sobrevivência. Os autores acima citados encontraram contagem total de 960 colônias de leveduras/g de amostra seca, compreendendo uma população mista de leveduras dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Kluyveromyces* e *Debaryomyces* de silagens de milho puro.

No Brasil, um dos problemas enfrentados com fermentação por leveduras ocorre em silagens de cana-de-açúcar, com alto nível de fermentação alcoólica. Nessas culturas, há a necessidade de utilização de aditivos que inibam essa atividade. Bravo-Martins et al. (2006) constataram redução, na população de leveduras em silagens de cana-de-açúcar ensiladas por um período de 30 dias, de 6,5 log ufc/g de silagem nas silagens sem aditivos para valores médios de 5,87 e 5,5 log ufc/g, respectivamente, para as silagens adicionadas com 1% de sulfato de amônio e 1% de uréia.

### **2.3 Uso de inoculantes no processo de ensilagem**

Para que se possa produzir uma silagem de boa qualidade de uma forrageira, esta deve obedecer a alguns requisitos, como teor de MS adequado no

momento da ensilagem (30 a 35% de MS); alta concentração de carboidratos solúveis (CHO) e baixo poder tampão. No entanto, sabe-se que nem todas as forrageiras apresentam tais características em função da própria planta e/ou das práticas de manejo. Assim, deve-se lançar mão de algum meio para que o processo de fermentação não seja prejudicado.

Os inoculantes bacterianos são classificados como estimulantes da fermentação, os quais agem através da adição de culturas bacterianas, constituindo os grupos de aditivos mais utilizados em todo o mundo (McDonald et al., 1991).

As vantagens de utilizar aditivos biológicos são a sua segurança e facilidade de uso, além de não serem corrosivos para o maquinário, não poluírem o meio ambiente e serem produtos naturais. Diante disso, existe um grande número de estudos relacionados ao uso de inoculantes em silagens; no entanto, os resultados ainda são contraditórios em relação à melhoria no processo fermentativo, no valor nutritivo, na digestibilidade das silagens, no consumo de MS e no ganho de peso.

Vários fatores podem contribuir para essa grande variabilidade, os quais estão relacionados à forragem, como concentração de carboidratos fermentecíveis, teor de umidade, microbiota epifítica, tipo e viabilidade dos inóculos utilizados e, principalmente, condições de ensilagem.

Quanto aos fatores relacionados aos inoculantes, muitas vezes o insucesso da inoculação das silagens pode ser decorrente da seleção inadequada dos microrganismos para o tipo de forragem que se deseja ensilar. Segundo Whiter & Kung Jr. (2001), o efeito de determinado inoculante pode estar relacionado às condições da ensilagem, às características da cultura e às características específicas de cada cepa. Em um estudo conduzido por esses autores, verificou-se que as respostas variaram em função do teor de MS da forragem e da forma de aplicação do inoculante. Os autores concluíram que

esses resultados foram específicos para essa cepa e que os dados não devem ser extrapolados para outros inoculantes.

No Brasil, a maioria dos experimentos que avaliaram inoculantes microbianos possibilitou a formulação de conclusões com base em resultados de análises químicas sem, no entanto, fazer um estudo mais detalhado dos microrganismos envolvidos, levando muitas vezes à confusão no entendimento dos resultados. Nos Estados Unidos e Europa, Muck & Kung Jr. (1997), em um levantamento de dados de 221 experimentos sobre o uso de inoculantes entre os anos de 1990 a 1995, verificaram que em 60% dos casos houve menores valores de pH e maior fermentação láctica; também, em similar proporção houve menor produção de amônia, mostrando melhor preservação de proteína (148 experimentos). Em aproximadamente 30% dos casos, houve aumento de cinco unidades percentuais na digestibilidade da MS (82 experimentos); e em 28% de experimentos estudados, houve acréscimo no consumo.

Segundo Morais (1995), muitos produtos comerciais são utilizados como aditivos sem serem devidamente testados, sendo usados, muitas vezes, de forma exagerada. Essa falta de informações técnicas confiáveis sobre o produto leva o produtor à substituição de boas técnicas de manejo do silo por aditivos, o que, certamente, resulta em uma diminuição da qualidade do produto ensilado. Assim, é muito importante que se realizem estudos com inoculantes para silagens contendo cepas isoladas de silagens produzidas nas condições tropicais. Segundo Cachpoole & Henzel (1971), existem diferenças entre as bactérias das silagens tropicais e aquelas das de clima temperado.

A quantidade do produto pode variar de acordo com o tipo de forragem utilizada. As bactérias mais desejáveis, ou seja, as BAL, durante a ensilagem estão normalmente presentes na forragem em um número 1000 vezes menor que seus principais competidores, que são os fungos e enterobactérias (McDonald et al, 1991). Assim, quanto maior o número de BAL na forragem no momento da



ensilagem, menor será a competição com os microrganismos indesejáveis e a fermentação ocorrerá de forma satisfatória. Nesse contexto, muitos inoculantes contendo BAL homo e heterofermentativas têm sido desenvolvidos com o intuito de melhorar o processo de fermentação das silagens.

Durante muitos anos a comunidade científica dedicou seus estudos ao desenvolvimento de inoculantes que melhorassem o processo fermentativo utilizando cepas de BAL homofermentativas, para as quais o ácido láctico representa mais que 85% dos produtos finais do metabolismo. Esse ácido é mais eficiente na redução do pH das silagens do que outros ácidos produzidos durante a fermentação por BAL; as silagens inoculadas com essas bactérias apresentam mais rápida queda de pH e menor pH final e, conseqüentemente, são mais bem preservadas.

No entanto, os estudos mostraram que silagens bem preservadas apresentavam maiores problemas de deterioração aeróbia. Isso foi explicado pelo fato de essas silagens apresentarem alta concentração de ácido láctico e carboidrato residual, sendo estes produtos os substratos para o crescimento de microrganismos de deterioração aeróbica e também por conterem maior relação ácido láctico:ácido acético. O ácido acético é mais eficiente na inibição de fungos e leveduras; com isso, silagens com maior teor de ácido acético apresentam maior estabilidade aeróbia (McDonald et al, 1991).

A maioria dos trabalhos conduzidos avaliando a adição de BAL homofermentativas mostram que a inoculação com bactéria homoláctica, na ordem de  $1,5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  ufc/g, normalmente causa pequena ou nenhuma melhora na estabilidade aeróbica das silagens tratadas (Higginbothan et al., 1998; Ranjit & Kung, 2000). Cai et al. (1999) avaliaram duas cepas, *Lactobacillus casei* FG 1 e *Lactobacillus plantarum* FG 10, isoladas de culturas forrageiras para serem utilizadas como aditivos em silagens de alfafa, sorgo e azevém anual. A adição das duas cepas nos dois tipos de silagens resultou em silagens mais bem

preservadas do que a controle, o que pôde ser observado pelo menor pH, menor contagem de clostrídeos e bactérias aeróbicas, menor produção de gás e perda de MS. No entanto, as silagens inoculadas deterioraram mais rapidamente do que as silagens controle, que apresentaram maiores concentrações dos ácidos acético e butírico, o que, segundo os autores, contribuiu para aumentar a estabilidade das silagens controle.

Nos dias atuais, muitos pesquisadores têm se interessado pelo estudo de cepas de BAL heterofermentativas, como a cepa *Lactobacillus buchneri*. Essas bactérias produzem ácido acético, que é um ácido eficiente em inibir o crescimento de leveduras, as quais são as principais iniciadoras do processo de deterioração das silagens.

#### **2.4 Inibição da deterioração aeróbica da silagem**

O processo de ensilagem pode ser dividido, basicamente, em quatro fases: aeróbica, de fermentação, estável e abertura ou deterioração aeróbia. Essa última fase se inicia no momento em que o silo é aberto para o fornecimento das silagens aos animais ou quando o oxigênio penetra no silo por difusão ou por danos físicos do próprio silo. A exposição ao oxigênio proporciona o crescimento de microrganismos aeróbios facultativos que sobreviveram inativos na ausência do oxigênio. Esses microrganismos utilizam vários substratos derivados diretamente da forragem ou indiretamente da fermentação. Essa fase está associada com perdas de nutrientes e é definida como deterioração aeróbia, na qual, tipicamente, um ou dois picos de temperatura são determinados em função da atividade de leveduras e fungos filamentosos (Nishino et al., 2002).

Leveduras e alguns fungos filamentosos são os microrganismos mais importantes envolvidos na deterioração aeróbia da silagem, catabolizando ácido láctico, propiônico e açúcares. As leveduras envolvidas parecem compreender

uma restrita variação de gêneros utilizadores de ácidos, representados por espécies dos gêneros *Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula* e *Pichia*, enquanto as utilizadoras de açúcares são principalmente espécies dos gêneros *Torulopsis* (Woolford, 1984).

Anteriormente se pensava que as bactérias tinham um papel secundário na deterioração aeróbica da silagem; porém, segundo McDonald et al. (1991), as bactérias exercem uma função na deterioração das silagens muito mais importante do que se acreditava. Existem indicações de que as principais bactérias envolvidas na deterioração aeróbica das silagens são as espécies do gênero *Bacillus*, porém tem sido observado o crescimento de algumas BAL. As bactérias ácido acéticas também podem ter um importante papel na deterioração aeróbica das silagens, podendo iniciá-la, já que elas são capazes de oxidar lactato e acetato a CO<sub>2</sub> e água. Essas bactérias são aeróbicas obrigatórias e tolerantes às condições ácidas, encontrando, na silagem, um ambiente propício para se desenvolverem (Oude Elferink et al., 2001). As enterobactérias e a listéria (*Listeria monocytogenes*) também estão envolvidas na deterioração aeróbica das silagens, existindo uma relação direta entre a contaminação com essas duas espécies. A contaminação causa degradação da silagem e possíveis prejuízos sanitários aos animais e ao homem (Jobim e Gonçalves, 2003).

O processo pode ser dividido em duas etapas. O primeiro estágio de deterioração é a deterioração oriunda da degradação dos ácidos orgânicos preservantes por leveduras e, ocasionalmente, por bactérias ácido acéticas. Isto pode causar um aumento no pH e, assim, o segundo estágio de deterioração é iniciado, sendo associado com o aumento da temperatura e a atividade de outros microrganismos deterioradores, como bacilos. O último estágio também inclui a atividade de muitos outros microrganismos aeróbicos, como fungos filamentosos e enterobactérias (Oude Elferink et al., 2001).

O principal problema da deterioração aeróbica da silagem resulta da mineralização completa dos nutrientes facilmente oxidáveis à dióxido de carbono e água pela ação microbiana em presença de oxigênio atmosférico. Quimicamente, esse processo pode ser expresso pela equação da respiração de hexoses ( $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{energia}$ ) (Guim et al., 2002).

As medidas a serem tomadas para controlar a deterioração aeróbica das silagens inclui os cuidados desde a colheita, picagem e compactação até o fechamento do silo. A compactação e o fechamento do silo devem ser efetuados o mais eficiente e rapidamente possível para evitar um prolongamento da fase aeróbica, permitindo rápida queda do pH e inibição do crescimento dos microrganismos indesejáveis. Na maioria dos casos, as leveduras são as responsáveis pela iniciação do processo de deterioração. Assim, os métodos que inibem o seu crescimento são eficientes em aumentar a estabilidade aeróbica da silagem (Driehuis et al., 1999).

Durante o processo de fermentação vários compostos são produzidos, sendo difícil a avaliação do potencial de cada um, separadamente, em inibir os microrganismos deterioradores de silagem em experimentos. Danner et al. (2003) estudaram o efeito de alguns compostos que são produzidos naturalmente em silagens sobre a sua estabilidade, adicionando-os separadamente às mesmas, em concentrações que podem ser observadas naturalmente, e comparando-as com a silagem controle. Os compostos avaliados foram ácido acético, ácido butírico, 1,2-propanodiol, 1-propanol, manitol e frutose. A adição de ácido acético puro resultou em aumento da estabilidade aeróbica de 79 (35 g/kg) para 339 (79,5 g/kg) horas, enquanto a adição de ácido acético tamponado resultou em aumento de 57 (35 g/kg) para 150 horas (79,5 g/kg). A adição de 1-2 propanodiol e 1-propanol às silagens só provocou aumento na sua estabilidade aeróbica quando as concentrações foram maiores que 45,8 g/kg e 20,0 g/kg, respectivamente. Entretanto, concentrações tão altas desses compostos não são

normalmente encontradas em silagens. A adição de ácido butírico melhorou a estabilidade aeróbica da silagem; no entanto, a presença deste ácido é indicativa da presença de clostrídeos, que são indesejáveis em silagens. A adição de frutose e manitol às silagens reduziu a estabilidade aeróbica das mesmas. Isto ocorreu porque esses compostos são fontes adequadas de carbono para os microrganismos deterioradores de silagem, como leveduras e fungos filamentosos.

Estudos têm mostrado que o ácido acético é mais eficiente em inibir o crescimento de fungos do que o ácido láctico. Assim, cepas de BAL heterofermentativas que produzem ácido acético em adição ao ácido láctico têm despertado a atenção dos pesquisadores nos últimos anos.

## **2.6 A espécie *Lactobacillus buchneri* e sua ação sobre a estabilidade aeróbia das silagens**

*Lactobacillus buchneri* é uma espécie de BAL heterofermentativa obrigatória que tem habilidade para metabolizar o ácido láctico a ácido acético e 1,2-propanodiol sob condições anaeróbicas. Segundo Oude Elferink et al. (2001), 1,2-propanodiol é produzido durante a degradação anaeróbica do ácido láctico e esse processo pode ser marcadamente acelerado no decorrer da ensilagem, levando à formação de maior quantidade daquele composto. Esses autores sugeriram a estequiometria de degradação do ácido láctico de acordo com a seguinte equação: 1 mol de ácido láctico  $\rightarrow$  0,48 ácido acético + 1,2-propanodiol + 0,04 etanol + 0,52CO<sub>2</sub>. Todavia, tem sido mostrado que microrganismos da silagem podem degradar 1,2-propanodiol a ácido propiônico e 1-propanol, resultando no acúmulo de 1-propanol na silagem inoculada (McDonald et al., 1991).

Danner et al. (2003) observaram que as silagens inoculadas com BAL homofermentativas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* e *L. plantarum*) apresentaram estabilidade aeróbia menor (26 a 31 horas) que silagens sem inoculantes (40 horas) e silagens inoculadas com BAL heterofermentativas (274 horas para *L. buchneri* e 72 horas para *L. brevis*). As silagens inoculadas com *L. buchneri* continham quantidades muito pequenas de ácido láctico; no entanto, foram observadas quantidades altas de ácido acético e também quantidades significativas de 1,2-propanodiol. Esses dados mostram que a estabilidade aeróbia está mais relacionada com a concentração de ácido acético do que com a de ácido láctico e o pH final. Esses autores também avaliaram o efeito de três compostos, isolados na inibição de duas espécies de leveduras e duas de fungos, e observaram que o ácido acético foi muito eficiente na inibição do crescimento de leveduras e fungos filamentosos.

Em geral, silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentam contagem mais alta de BAL e pH mais alto em face da conversão do ácido láctico em ácidos acético e propiônico e álcoois, sendo que estes dois ácidos possuem um valor de pKa mais alto que o ácido láctico (Driehuis et al., 1999). Os autores concluíram, então, que há um aumento na conversão do ácido láctico para ácido acético à medida que o pH é reduzido. Torna-se muito importante conhecer o efeito do pH nessa conversão para se obterem informações sobre o momento em que o processo se inicia dentro das silagens tratadas (Oude Elferink et al., 2001).

Segundo Danner et al. (2003), a atividade antimicrobiana do acetato ou lactato é causada por moléculas ácidas não dissociadas lipofílicas que penetram no plasma da membrana bacteriana. A dissociação dessas moléculas dentro da célula promove liberação de prótons, acidifica o citoplasma e prejudica o crescimento microbiano. A característica de proteção através da presença do ácido acético ocorre não pela morte dos microrganismos, mas pela inibição do seu crescimento.

O efeito antimicrobiano de um ácido orgânico depende do seu pKa e do pH do meio. O ácido láctico tem um pKa de 3,86, sendo mais forte que o ácido acético, que tem um pKa de 4,75. Isso resulta em uma mais alta atividade antimicrobiana do ácido acético em ambientes onde os valores de pH são baixos (cerca de pH 4,0), visto que mais alta proporção do acetato não é dissociada.

Vários autores têm explicado o efeito do *L. buchneri* sobre a estabilidade aeróbia das silagens pelo fato de que sua inoculação diminui a atividade das leveduras (Driehuis et al., 1999; Nishino et al., 2002, Ranjit e Kung Jr., 1999). De acordo com os autores, as leveduras foram afetadas de duas formas: primeiramente, a sobrevivência das leveduras durante a fermentação foi reduzida, resultando em substancial mais baixa contagem nas silagens inoculadas que na controle; posteriormente, o crescimento durante a exposição ao ar foi completamente inibido.

## **2.7 Efeito da silagem inoculada com *L. buchneri* sobre o seu consumo pelos animais**

Uma preocupação com relação ao uso de *L. buchneri* como inoculante para silagem é a possibilidade de redução da ingestão de MS pelos animais em razão da alta concentração de ácido acético. Todavia, estudos anteriores sugeriram que o ácido acético por si só pode não ser o fator primário que causa redução do consumo. Segundo Nussio et al. (2003), houve correlação negativa entre a concentração do total de ácidos orgânicos da silagem e o consumo voluntário pelos animais. Entretanto, as correlações com cada ácido orgânico individualmente não foram significativas, sugerindo que a acidez titulável total é mais importante que a contribuição específica de cada ácido orgânico.

Ranjit e Kung Jr. (2002), avaliando o consumo de silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* em silos de escala de fazenda e na concentração de

$4 \times 10^5$  ufc/g, notaram que a inoculação não causou nenhum efeito sobre o consumo de MS; no entanto, ovinos alimentados com essa dieta ganharam mais peso por dia (140 g/dia) do que aqueles alimentados com silagem não tratada (83 g/dia). A adição de *L. buchneri* à silagem de milho não causou nenhum efeito sobre o consumo ou produção de leite por vacas leiteiras alimentadas com essa silagem. Nesse estudo, a silagem controle (sem inoculante) continha, em média, 12,2 g/kg de MS de ácido acético e 7,1 log ufc/g de leveduras, enquanto a silagem inoculada continha 18,5 g/kg de MS de ácido acético e 5,7 log ufc/g de leveduras (Driehuis et al., 1999b).

Pedroso (2003), avaliando 4 tipos de ração compostas com silagem de cana controle (sem aditivos); uréia (0,5% da MV); benzoato de sódio (0,1% da MV) e *Lactobacillus buchneri* ( $3,64 \times 10^5$  ufc/g MV), concluiu que houve tendência de maior ingestão de MS (9,60 kg/dia), maior ganho de peso médio diário (aumento de 32%) e melhor conversão alimentar (7,72) das silagens com *L. buchneri* em relação ao controle (9,37).

Os resultados supracitados mostram que silagens tratadas com *L. buchneri*, com mais altas concentrações de ácido acético, não deprimem a ingestão de MS pelos animais.

É sabido que uma extensiva fermentação heterolática aumenta as perdas de matéria seca durante a ensilagem; no entanto, é preciso avaliar se essas perdas são mais expressivas do que as decorrentes da deterioração aeróbica ou, no caso da silagem de cana, da produção de etanol.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Ed.). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 1-72.

BOLSEN, K. K. Silage: basic principles. In: BARNES, R. F.; MILLER, D. A.; NELSON, C. J. Forages. 5. ed. Ames: Iowa State University, 1995. p. 163-176.

BRAVO-MARTINS, C. E. C.; CARNEIRO, H.; CASTRO-GOMES, R. J.; FIGUEIREDO, H. C.; SCHWAN, R. F. Chemical and microbiological evaluation of ensiled sudar cane with different additives. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 499-504, Dec. 2006.

CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M.; KUMAI, S. Effect of Applying Lactic Acid Bacteria Isolated from Forage Crops on Fermentation Characteristics and Aerobic Deterioration of Silage. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 82, n. 3, p. 520–526, Mar. 1999.

CATHPOOLE, V. R.; HENZEL, E. F. Silage and silage-making from tropical herbage species. Herbage Abstracts, Farnham Royal, v. 41, n. 3, p. 213-221, May/June 1971.

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, Oxford, v. 87, n. 4, p. 583–594, Oct. 1999a.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. *Lactobacillus buchneri* improves aerobic stability of laboratory and farm scale whole crop maize silage but does not affect feed intake and milk production of dairy cows. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 12., 1999, Uppsala. Proceedings... Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1999b. p. 106-107.

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 69, n. 1, p. 562–567, Jan. 2003.

DEVRIESE, L. A.; COLLINS, M. D.; WIRTH, R. The genus *Enterococcus*. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.;

SCHLEIFER, K. H. (Ed). **The Prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. v. 1, p. 719-767.

EL-SHANAWANY, A. A.; MOSTAFA, M. E.; BARAKAT, A. . Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic Aspergilli toxins. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 159, n. 2, p. 281–289, Feb. 2005.

GIFFEL, M. C.; WAGENDORP, A.; HERREWEGH, A.; DRIEHUIS, F. Bacterial spores in silage and raw milk. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dorecrecht, v. 81, n. 1/4, p. 625–630, 2002.

GOLIEB, A. Causes of mycotoxins in silages. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK, NORTH AMERICAN CONFERENCE, 19997, Hershey, PA. **Proceedings...** Hershey, PA: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1997. p. 213–221.

GUIM, A; ANDRADE, P.; ITURRINO-SCHOCKEN, R. P.; FRANCO, G. L.; RUGGIERI, A. C.; MALHEIROS, E. B. Estabilidade Aeróbica de Silagens de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) Emurchecido e Tratado com Inoculante Microbiano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2176-2185, nov./dez. 2002

HAMMES, W. P.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. H The genus *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Ed). **The Prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. v. 1, p. 719-767.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILINGER, U. The genus *Leuconostoc*. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Ed). **The Prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. v. 1, p. 719-767.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D. Microbiologia de Forragens conservadas. In: VOLUMOSOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES, 1., 2003, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 1995. p. 1-26.

LYTHE, M. D.; RUSSELL, J. B. The effect of pH and a bacteriocin (bovicin HC5) on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acids in ensiled plant materials. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, n. 2, p. 215-222, Feb. 2004.

- MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 986 p.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. **Biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe Publication, 1991. 340 p.
- MORAIS, J. P. G. **Avaliação do efeito do uso de inoculante bacteriano sobre a qualidade da silagem e desempenho animal**. 1995. 77 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia- área de concentração: Ciência animal e pastagens) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- MUCK, R.; KUNG Jr., L. Effects of silage additives on ensiling. In: SILAGE FIELD TO FEEDBUNK NRAES 99 HERCHEY, 1997. **Proceedings**. Herchey: NRAES, 1997. p. 187-199.
- NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H.; SAKAGUCHI, E. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 800-807, 2003
- NUSSIO, L. G.; SCHMIDT, P.; PEDROSO, A. F. Silagem de cana-de-açúcar In: FORRAGICULTURA E PASTAGENS: temas em evidência – sustentabilidade, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: Editora UFLA, 2003. p. 49-72.
- OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHAL, J. C. Silage fermentation processes and their manipulation. In: FAO ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE, 1999, Rome. Silage making in the tropics with emphasis on smallholders. **Proceedings**. Rome: FAO, 2000. p. 17-30.
- OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J. A.; SPOELSTRA, S. F.; FABER, 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, Jan. 2001
- PEDROSO, A. F. **Aditivos químicos e microbianos no controle de perdas e na qualidade de silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2003. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- RANJIT, N. K.; TAYLOR, C. C.; AND KUNG JR, L. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of

maize silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 73-81, June 2002.

SANTOS, V. M.; DORNER, J. W.; CARREIRA, F. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 156, n. 2, p. 133–138, 2002.

WEISS, N. The genus *Pediococcus* and *Aerococcus*. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Ed). **The Prokaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1992. v. 1, p. 719-767.

WHITER, A. G.; KUNG, JR, L. . The Effect of a Dry or Liquid Application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the Fermentation of Alfalfa Silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 10, p. 2195–2202, Oct. 2003.

WINTERS, A. L.; WHITTAKER, P. A.; WILSON, R. K. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 191-196, June 1987.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. 350 p.

## **CAPÍTULO 2**

### **ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS HETEROFERMENTATIVAS**

## RESUMO

Os inoculantes microbianos são um dos aditivos mais utilizados em silagens em função da segurança e facilidade no seu uso. No entanto, para o sucesso da aplicação de inoculantes microbianos em silagens, deve haver compatibilidade entre a forragem e os microrganismos utilizados. Esse trabalho teve como objetivos isolar, caracterizar e identificar uma cepa bacteriana classificada como *L. buchneri* da silagem em cana-de-açúcar. Para tanto, foram coletadas 80 g de amostras de silagem de cana pura aos 5, 20, 40 e 80 dias de fermentação, misturadas com 720 ml de água peptonada estéril e agitadas durante 20 minutos. A partir do extrato obtido foram preparadas diluições decimais de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  e feito plaqueamento em meio MRS. As placas foram incubadas a 30°C por 24-48 horas. Após esse período foi escolhida, para morfologia de colônia, uma placa e diluição cuja contagem esteve entre 30 e 300 colônias. Os isolados selecionados foram purificados e submetidos aos testes específicos coloração de gram, catalase, motilidade e produção de gás a partir da glicose para classificação das mesmas quanto ao gênero. Para identificação das espécies foi utilizado o sistema API (BioMerieux, Marcy I'Toile, France). Ao final foram obtidos 72 isolados, todos classificados como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Destes, apenas 13 (18%) produziram gás e foram identificados. Nos isolados identificados foram encontradas 3 espécies diferentes, *L. plantarum* (1 isolado), *L. buchneri* (2 isolados) e *L. brevis* (8 isolados), e 2 cepas não foram identificadas. Com isso, sugere-se que a espécie *L. brevis* é a bactéria heterofermentativa dominante durante a fermentação da silagem de cana-de-açúcar.

## ABSTRACT

Microbial inoculants are one of the additives most utilized in silages as related with safety and ease of use. Nevertheless, for the successful application of microbial inoculants in silages, there must be compatibility between the forage and microorganisms utilized. It was aimed by this work to isolate, characterize and identify a bacterial strain classified as *L. buchneri* of sugarcane silage. So, 80 g of plain sugar cane silage at 5, 20, 40 and 80 days of fermentation, mixed with 720 ml of sterile peptonized water and shaken for 20 minutes were collected. From the extract obtained, decimal dilutions of  $10^{-1}$  to  $10^{-6}$  and plating in MRS medium were prepared. The dishes were incubated at 30°C for 24-48 hours. After this period, for colony morphology, dish and dilution were chosen that count of which lay between 30 and 300 colonies. The selected isolates were purified and submitted to the specific tests: gram coloration, catalysis, motility and gas production from glucose for classification of them at the genus level. For identifying the species, the API system (BioMerieux, Marcy l'Étoile, France) was utilized. At the end, 72 isolates were obtained, all of them being classified as belonging to the genus *Lactobacillus*. Out of these, only 13 (18%) produced gas and were identified. In the isolates identified, 3 different species, *L. plantarum* (1 isolate), *L. buchneri* (2 isolates) and *L. brevis* (8 isolates) were found and 2 strains were not identified. From this, it is suggested that the species *L. brevis* is the heterofermentative bacterium dominant during the fermentation of sugar cane silage.

## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias do ácido láctico (BAL) são um grupo de bactérias que tem como característica mais importante a produção de ácido láctico como principal, ou único, produto do seu metabolismo. São bactérias gram positivas, microaerofílicas, usualmente não móveis e não esporulantes. É o principal grupo de microrganismos que atua no processo fermentativo para conservação da massa ensilada. Dentre as BAL, as mais importantes envolvidas com o processo de fermentação da silagem são as dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*. Segundo Hammes et al. (1991), na silagem ocorre uma sucessão de gêneros e espécies de BAL. No estágio inicial, as bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* dominam o processo, seguidas por *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são mais resistentes às condições ácidas.

Os lactobacilos tem, tipicamente, forma de bacilos, variando de longos e finos a curtos e curvados. A maioria das espécies é homofermentativa, mas algumas são heterofermentativas. Os lactobacilos são usualmente mais resistentes às condições ácidas do que as outras BAL, podendo crescer bem em pH em torno de 4,0 a 5,0. Por causa disso eles podem ser isolados de materiais naturais pelo uso de meios contendo carboidratos com pH baixo. Essa resistência à acidez faz com que os lactobacilos possam continuar crescendo durante fermentações lácticas naturais, nas quais os valores de pH reduzem a valores tão baixos que outras bactérias não podem crescer. Sendo assim, os lactobacilos são geralmente responsáveis pelos estádios finais da maioria das fermentações lácticas (Madigan et al., 1997).

Durantes muitos anos, a comunidade científica voltou seus estudos para o desenvolvimento de inoculantes que melhorassem o processo fermentativo utilizando cepas de BAL homofermentativas, para as quais o ácido láctico



representa mais que 85% dos produtos finais do seu metabolismo (McDonald et al., 1991), sendo este ácido mais eficiente na redução do pH das silagens do que outros ácidos produzidos durante a fermentação por BAL; as silagens inoculadas com estas bactérias apresentam mais rápida queda e menor pH final e são, conseqüentemente, mais bem preservadas (Bolsen, 1995). Todavia, os estudos mostraram que silagens bem preservadas apresentavam maiores problemas de deterioração aeróbia (Cai et al., 1999; Ranjit & Kung, 2002). Isso foi explicado pelo fato de estas silagens apresentarem alta concentração de ácido láctico e carboidrato residual, substratos para crescimento de microrganismos de deterioração aeróbia, e também por conterem maior relação ácido láctico:ácido acético. O ácido acético é mais eficiente na inibição de fungos filamentosos e leveduras; com isso, silagens com maior teor de ácido acético apresentam maior estabilidade aeróbia (Danner et al., 2003).

Nos dias atuais, muitos pesquisadores voltaram-se para o estudo de cepas de BAL heterofermentativas como a cepa *Lactobacillus buchneri*, que tem habilidade para metabolizar o ácido láctico a ácido acético e 1,2-propanodiol sob condições anaeróbicas (Filya, 2003; Driehuis et al., 1999; Oude Elferink et al., 2001; Pedroso et al., 2005).

Os inoculantes microbianos são um dos grupos de aditivos mais utilizados em silagens em todo o mundo. As vantagens de utilizar aditivos biológicos são a sua segurança e facilidade de uso, além de não serem corrosivos para o maquinário, não poluírem o meio ambiente e serem produtos naturais (McDonald et al., 1991).

No Brasil já foram realizados vários trabalhos com a utilização de inoculantes, obtendo-se resultados positivos e negativos. Muitas vezes o insucesso da inoculação das silagens pode ser devido à seleção inadequada dos microrganismos para o tipo de forragem que se pretende ensilar. Segundo Morais (1995), muitos produtos comerciais são utilizados como aditivos sem

serem devidamente testados e, por vezes, de forma exagerada. A falta de informações técnicas confiáveis sobre o produto leva o produtor à substituição de boas técnicas de manejo do silo por aditivos, o que certamente resulta em uma diminuição da qualidade do produto ensilado. Assim, é muito importante que se realizem estudos com inoculantes para silagem contendo cepas isoladas de silagens produzidas nas condições tropicais, pois existem diferenças entre as bactérias que crescem em silagens tropicais e aquelas de clima temperado (Cathpoole & Henzel, 1971).

Segundo Muck (2001), um dos fatores determinantes para o sucesso da aplicação de inoculantes microbianos em silagens é a compatibilidade entre a planta e os microrganismos utilizados. Hill (1989) isolou três cepas de *Lactobacillus plantarum* de milho, alfafa e sorgo, que foram aplicadas nas respectivas espécies de plantas por ocasião da ensilagem, e verificou que a estirpe dominante em cada silagem foi a natural de cada planta. Isto indica que a cepa de um determinado inoculante cresce melhor na espécie forrageira em que foi encontrada.

Esse trabalho teve como objetivos isolar, caracterizar e identificar uma cepa de *L. buchneri* da silagem de cana-de-açúcar para uso como inoculante em silagens posteriores.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem e contagem do número de bactérias do ácido láctico

Para isolamento da bactéria, a cana-de-açúcar foi colhida de um canavial estabelecido em área pertencente à UFPA, com aproximadamente 12 meses de idade, na estação seca, quando apresentava alto teor de carboidratos solúveis. A colheita foi feita com facão e o material, picado em máquina estacionária, proporcionando partículas de 10 a 30 mm para a produção da silagem.

Em seguida processou-se a ensilagem em silos de PVC com diâmetro de 10 cm e altura de 80 cm, adaptados com válvula tipo Bunsen, com capacidade para aproximadamente 2,5 a 3 kg de silagem, sendo então utilizada uma densidade de compactação dos silos de aproximadamente 600 kg de forragem por m<sup>3</sup>. Foram ensilados, no total, oito silos, dois para cada época de abertura (5, 20, 40 e 80 dias de fermentação).

Por ocasião das épocas de abertura, retirou-se uma amostra de 80g da silagem em cada silo, a qual foi colocada assepticamente em Erlenmeyers com 720ml de água peptonada estéril (1% de peptona), esterilizada a 121°C/ 15 min.), e agitadas durante 20 minutos. A partir do extrato obtido, foram preparadas diluições decimais de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>. Para determinação da contagem total de bactérias, foi tomado 0,1 ml de cada diluição, em triplicata, o qual foi espalhado com alça de Drigalsky em meio MRS (Tabela 15A), acrescido de nistatina (4 ml por litro de meio), para contagem de bactérias do ácido láctico. As placas foram incubadas a 30°C e a contagem total de bactérias foi realizada após 24-48 horas de incubação.

## **2.2 Isolamento e identificação dos microrganismos**

A partir da contagem total foi escolhida, para morfologia de colônia, uma placa e diluição cuja contagem esteve entre 30 e 300 colônias. O número de isolados selecionados para identificação foi determinado calculando-se a raiz quadrada do número total de isolados contados conforme mencionado no *Bacteriological Manual for Foods* (FDA, 1972). A morfologia de colônia incluiu as seguintes características observadas: tamanho da colônia (análise comparativa com outras colônias presentes naquele meio), forma, elevação, cor e bordo.

Após a seleção dos isolados a serem identificados estes foram repicados, por meio de estrias compostas, até que as colônias nas placas estivessem puras, o que foi avaliado em microscópio. Os isolados foram purificados e, das culturas puras de bactérias, foram realizados testes de coloração diferencial de Gram. Os microrganismos Gram-positivos foram submetidos à realização de testes específicos: catalase, motilidade e produção de gás, a partir da glicose (Macfaddinn, 1980).

A identificação quanto ao gênero foi feita com base nos testes acima citados, utilizando tabelas e chaves diferenciais (Hammes et al., 1992; Silveira, 2001). As bactérias que produziram gás a partir da glicose, ou seja, heterofermentativas, foram identificadas quanto à espécie utilizando o sistema API (BioMerieux, Marcy l'Étoile, France). Este sistema consiste de uma galeria chamada API 50 CH, ou seja, uma galeria contendo 50 carboidratos depositados em microtubos para estudos de fermentação, e uma zona de anaerobiose (cúpula) para estudos de oxidação. O meio utilizado para crescimento 24 horas antes da inoculação nas galerias foi o meio API 50 CHL. Os isolados bacterianos identificados foram transferidos para criotubos contendo MRS líquido, acrescidos de glicerol para uma concentração final de 20% e congelados a -80° C.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os números de células viáveis e de morfotipos isolados das silagens de cana-de-açúcar estão mostrados na Tabela 1. A contagem de BAL foi alta, em torno de 9 log ufc/g de silagem, e semelhante nos tempos 5, 20 e 40 dias, com pequena redução aos 80 dias (7,8 log ufc/g de silagem). Essa população alta de BAL em silagem de cana é decorrente da alta concentração de carboidratos solúveis existente nesta gramínea, em torno de 30% (Freitas et al. 2006; Pedroso et al. 2003). Em trabalhos realizados com silagem de cana foram encontrados populações semelhantes de BAL, sendo que, em alguns deles, houve redução da população com o decorrer do processo e, em outros, a população continuou viável até abertura dos silos. Bravo-Martins et al. (2006) verificaram populações de BAL de 8,5; 6,5; 8,5 e 6,8 log ufc/g de silagem para silagens de cana-de-açúcar com 10, 20, 30 e 40 dias de fermentação, respectivamente. Pedroso (2003) verificou redução de 7,8 para 3,6 log ufc/g de silagem durante 110 dias de fermentação, o que o autor atribuiu à inibição das BAL pelo próprio ácido láctico produzido.

O número de morfotipos diferentes encontrados em cada tempo de abertura variou de 4 a 6 (Tabela 1). Não foram encontrados trabalhos envolvendo a caracterização de morfotipos de bactérias em silagens de cana com base no aspecto visual das colônias. As características visuais avaliadas foram tamanho, cor, forma, bordo, elevação e textura. Estas características não serão aqui discutidas porque foram utilizadas somente com o intuito de escolher isolados representativos de cada morfotipo diferente, para a identificação da espécie desejada (*L. buchneri*), e não de comparação entre tratamentos ou de descrever a diversidade de bactérias em silagens de cana. Contudo, ao final de todos os tempos de abertura foram obtidos 72 isolados para serem identificados.

**TABELA 1**– Valores do número de células, número de morfotipos diferentes caracterizados e número de isolados das silagens de cana-de-açúcar em diferentes períodos de fermentação

Tempo de fermentação (dias)	Número de células (log da ufc/g de silagem) média de 2 silos.	Número de morfotipos	Número de isolados	Número de isolados heterofermentativos
5	9,973	6	22	6 (27%)
20	9,394	5	18	2 (11%)
40	9,134	4	12	4 (33%)
80	7,875	7	20	2 (10%)
<b>Total</b>			<b>72</b>	<b>13 (18%)</b>

### 3.1 Testes bioquímicos para identificação das espécies de bactérias

Todos os 72 isolados das silagens de cana foram classificados como bactérias gram positivas com forma de bacilo, catalase, oxidase e motilidade negativas. Com base nas chaves de identificação propostas por Hammes et al. (1992), Silveira (2001) propôs um esquema de agrupamento dos microrganismos, com base no qual todos os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, podendo ser homofermentativos, heterofermentativos facultativos ou heterofermentativos obrigatórios. Como o intuito do trabalho era somente encontrar, entre as populações de BAL das silagens de cana-de-açúcar, uma cepa que fosse identificada como *L. buchneri*, que é uma espécie de lactobacilos heterofermentativa obrigatória; somente os isolados que produziram gás foram identificados quanto à espécie.

Do total de 72 isolados, apenas 13 (18%) produziram gás e foram identificados. Nos isolados identificados foram encontrados 3 espécies diferentes, *L. plantarum* (1 isolado), *L. buchneri* (2 isolados) e *L. brevis* (8 isolados), e 2 cepas não foram identificadas (Tabela 2).

Sobre esses resultados podem ser feitas algumas observações, entre as quais a de que as BAL mais ativas durante a fermentação da silagem de cana pertencem ao gênero *Lactobacillus*. Segundo Hammes et al. (1992), na silagem ocorre uma sucessão de BAL. No estágio inicial, as bactérias pertencentes ao

gênero *Streptococcus* dominam o processo, seguidas por *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são mais resistentes às condições ácidas; porém, com o decorrer do processo, até as BAL pertencentes ao gênero *Lactobacillus* vão perdendo a viabilidade e alguns microrganismos especializados, tais como *Lactobacillus buchneri*, continuam ativos em um baixo nível (Oude Elferink et al., 2000). Entretanto, há que se considerar que, no caso da cana, o pH cai muito rápido. No presente experimento, com apenas 5 dias o pH já era de 3,5. Nesse caso, é provável que já tivesse ocorrido a sucessão microbiana e somente os lactobacilos estavam ativos.

Outra observação importante refere-se ao fato de que 82% das bactérias isoladas foram BAL homofermentativas. Em trabalho conduzido por Santos et al. (2006), identificando BAL presentes na microbiota epifítica dos capins Mombaça e Braquiária, verificou-se que a espécie predominante era *L. plantarum*. No presente estudo, somente foi identificado 1 isolado como *L. plantarum*. Entretanto, isso não significa que esta bactéria teve menor incidência, pois neste trabalho somente foram identificadas as bactérias heterofermentativas, e como a espécie *L. plantarum* é heterofermentativa facultativa, e portanto pode produzir gás em certas situações, ela foi identificada. Porém, estes dois trabalhos não podem ser comparados, pois Santos et al. (2006) identificaram bactérias da microbiota epifítica e no presente trabalho foram identificadas bactérias durante o processo de fermentação; além disso, foram estudadas espécies forrageiras diferentes.

A espécie de bactéria heterofermentativa dominante foi a espécie *L. brevis* (Tabela 2), que também é heterofermentativa obrigatória, com padrão fermentativo muito semelhante à espécie *L. buchneri*. Danner et al. (2003), avaliando a estabilidade aeróbia de silagens inoculadas com as espécies *L. buchneri* e *L. brevis*, verificaram maior estabilidade aeróbia para as silagens com *L. buchneri*. Estes dados sugerem que a inoculação com *L. buchneri* pode

melhorar a estabilidade devido ao fato de estas bactérias estarem presentes em pequena quantidade nas silagens.

A cepa utilizada nos estudos posteriores de fermentação das silagens de cana-de-açúcar e capim-mombaça foi a cepa UFLA 72 SIL, identificada como *Lactobacillus buchneri*, a qual, das cepas identificadas como pertencentes a esta espécie, foi a única que mostrou maior porcentagem de identificação pelo Software API. A cepa em questão foi isolada de uma silagem de cana-de-açúcar sem aditivos, com pH 3,5 e 80 dias de fermentação.

**TABELA 2** – Isolado, espécie bacteriana e porcentagem (%) de identificação de bactérias heterofermentativas isoladas da silagem de cana-de-açúcar.

<b>Isolado</b>	<b>Espécie</b>	<b>% de identificação</b>
UFLA 1 SIL	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	99,9
UFLA 10 SIL	Não identificável	
UFLA 13 SIL	<i>Lactobacillus brevis 3</i>	78,4
UFLA 14 SIL	<i>Lactobacillus buchneri</i>	80,6
UFLA 20 SIL	<i>Lactobacillus brevis 3</i>	88,8
UFLA 26 SIL	<i>Lactobacillus brevis 3</i>	80,7
UFLA 40 SIL	<i>Lactobacillus brevis 3</i>	98,3
UFLA 41 SIL	<i>Lactobacillus brevis 3</i>	99,8
UFLA 44 SIL	Não identificável	
UFLA 47 SIL	<i>Lactobacillus brevis 3</i>	99,9
UFLA 48 SIL	<i>Lactobacillus brevis 3</i>	99,8
UFLA 65 SIL	<i>Lactobacillus brevis 3</i>	93,9
<b>UFLA 72 SIL</b>	<b><i>Lactobacillus buchneri</i></b>	<b>99,9</b>



#### 4. CONCLUSÕES

As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* foram as mais ativas durante a fermentação da silagem de cana-de-açúcar, sendo *L. brevis* a bactéria heterofermentativa dominante. Os dados sugerem que a inoculação com *L. buchneri* pode melhorar a estabilidade aeróbia porque estas bactérias estão presentes em pequena quantidade nas silagens de cana-de-açúcar.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAVO-MARTINS, C. E. C.; CARNEIRO, H.; CASTRO-GOMES, R. J.; FIGUEIREDO, H. C.; SCHWAN, R. F. Chemical and microbiological evaluation of ensiled sudar cane with different additives. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 499-504, dec. 2006.
- BOLSEN, K. K. Silage: basic principles. In: BARNES, R. F.; MILLER, D. A.; NELSON, C. J. **Forages**. 5. ed. Ames: Iowa State University, 1995. p. 163-176.
- CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M.; KUMAI, S. . Effect of Applying Lactic Acid Bacteria Isolated from Forage Crops on Fermentation Characteristics and Aerobic Deterioration of Silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 3, p. 520–526, Mar. 1999.
- CATHPOOLE, V. R.; HENZEL, E. F. Silage and silage-making from tropical herbage species. **Herbage Abstracts**, Farnham Royal, v. 41, n. 3, p. 213-221, May/June 1971.
- DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. . Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 562–567, Jan. 2003.
- 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**, Oxford, v. 87, n. 4, p. 583–594, Oct. 1999.
- FREITAS, A. W. P.; PEREIRA, J. C.; ROCHA, F. C.; COSTA, M. G.; LEONEL, F. P.; RIBEIRO, M. D. Avaliação da qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar com aditivos microbianos e enriquecida com resíduo da colheita de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 38-47, jan./fev. 2006
- FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 1080–1086, 2003.

HAMMES, W. P.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. H. The genus *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Ed). **The Prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. e. 1, p. 719-767.

MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 986 p.

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

MORAIS, J. P. G. **Avaliação do efeito do uso de inoculante bacteriano sobre a qualidade da silagem e desempenho animal**. 1995. 77 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia- área de concentração: Ciência animal e pastagens) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

MUCK, R. Conserved forage (silage and hay) – progress and priorities. In: INTERNATIONAL GRASSLAND, 19., 2001, São Pedro, São Paulo, Brazil. **Anais...** São Pedro, 2001. 1CD-ROM.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHAL, J. C. Silage fermentation processes and their manipulation. In: FAO ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE: Silage making in the tropics with emphasis on smallholders, 1999, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2000. p. 17-30.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J. A.; SPOELSTRA, S. F.; FABER, 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, Jan. 2001

PEDROSO, A. F. **Aditivos químicos e microbianos no controle de perdas e na qualidade de silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2003. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PEDROSO, A. F.; NUSSIO, L. G.; PAZIANI, S. F.; LOURES, D. R. S.; IGARASI, M. S.; COELHO, R. M.; PACKER, I. H.; HORII, J.; GOMES, L. H. Dinâmica da fermentação e da microflora epífita em silagem de cana-de-açúcar. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 62, n. 5, p. 427-432, set./out. 2005.

RANJIT, N. K.; TAYLOR, C. C.; AND KUNG JR, L. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. **Grass and Forage Science**, Delaware, Oxford, v. 57, n. 2, p. 73–81, June 2002

SANTOS, E. M. ; PEREIRA, O. G.; PENTEADO, D. C. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; OLIVEIRA, J. S.; MANTOVAN, H. C.; SOUSA, L. O. Isolamento, identificação e caracterização de *lactobacillus* predominantes em gramíneas tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2006. 1CD-ROM.

SILVEIRA, I. A. **isolamento, caracterização e diversidade de bactérias envolvidas na fermentação natural do polvilho azedo**. 2001. 132 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos- área de concentração: Microbiologia de alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

## **CAPÍTULO 3**

### **PERFIL DE FERMENTAÇÃO E ESTABILIDADE AERÓBIA DAS SILAGENS DE CAPIM-MOMBAÇA TRATADAS COM *L. buchneri***

## RESUMO

A adição de *Lactobacillus* em silagens de gramíneas é feita com o intuito de aumentar a competitividade pelas BAL em relação a outros microrganismos indesejáveis, melhorando a sua qualidade fermentativa e sanitária, tanto durante o processo aeróbico quanto o anaeróbico. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de duas cepas de *L. buchneri*, uma proveniente de um inoculante comercial e outra isolada da silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), sobre o perfil de fermentação e estabilidade aeróbia das silagens de capim-mombaça. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com três silagens (sem inoculante e com inoculantes experimental e comercial) e seis tempos de abertura dos silos (0, 3, 10, 30, 60 e 90 dias). Para avaliação da estabilidade aeróbia utilizou-se. Também. um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, com parcelas subdivididas no tempo, em um esquema do tipo 6 x 4, ou seja, três silagens (silagens sem inoculantes e com inoculante experimental e comercial) e quatro tempos de avaliação aeróbica das silagens (0, 2, 8, e 10 dias após a abertura dos silos). Após um período de ensilagem de 90 dias, os silos foram abertos e destes foram retiradas amostras de cerca de 3,0 kg para avaliação da estabilidade aeróbica com base na temperatura e nas modificações químicas e microbiológicas ocorridas. A adição do inoculante influenciou as modificações ocorridas ao longo do perfil de fermentação para a maioria das variáveis estudadas. Entretanto, a composição química final da silagem não foi alterada, com valores médios de MS, PB, FDN e FDA, respectivamente, de 26,6; 7,03; 68,5 e 40,5%. Os dois inoculantes inibiram crescimento de leveduras e fungos filamentosos, porém o inoculante comercial foi mais eficiente até o final do processo, quando estas populações estiveram abaixo do nível mínimo de detecção (2,0 log ufc/g). A inoculação influenciou o perfil de produção dos ácidos graxos voláteis, mas ao final do processo as silagens sem inoculante apresentaram maior concentração de ácido láctico e acético e menores de ácidos propiônico e butírico. As silagens mostraram altos valores de pH e concentrações de nitrogênio amoniacal e ácido butírico. Assim que os silos foram abertos, foram verificadas modificações nas silagens, com aumento nas populações de BAL, leveduras e fungos filamentosos. Também foram verificados aumentos dos valores de pH, resultante da redução da concentração dos ácidos orgânicos, e aumentos dos teores de MS e PB. A adição de *L. buchneri* às silagens melhorou a sua estabilidade, não havendo aquecimento durante todo o período avaliado, o que foi conseqüência de uma associação de altas concentrações de ácido acético ao ácido propiônico e à menor concentração de ácido láctico no momento de abertura dos silos.

## ABSTRACT

Addition of *Lactobacillus* in grass silages is done with the purpose of increasing the competitiveness of LABs in relation to the other undesirable microorganisms, improving their fermentative and sanitary quality, both during the aerobic and anaerobic process. It was aimed by this work to evaluate the effect of the addition of two strains of *L. buchneri*, one coming from a commercial inoculant and the other isolated from sugar cane silage (*Saccharum* spp.) on the fermentation profile and aerobic stability of the Mombaça grass silages. The experiment was conducted in a completely randomized design with three silages (without inoculant and with experimental and commercial inoculants) and six times of silo-opening (0, 3, 10, 30, 60 and 90 days). For evaluation of the aerobic stability, a completely randomized design with three replicates with splitplot in time in a 6 x 4 type scheme, that is, three silages (silages without inoculant and with experimental or commercial inoculants) and four times of aerobic evaluation of the silages (0, 2, 8, and 10 days after the opening of the silos) was also utilized. After an ensiling period of 90 days, the silos were opened and from these were removed samples of about 3.0 kg for evaluation of the aerobic stability on the basis of temperature and chemical and microbiological modifications occurred. The addition of the inoculant influenced the modifications occurred along the fermentation profile for the majority of the variables studied. However, the final chemical composition of the silage was not altered, with average values of DM, CP, NDF and ADF, respectively of 26.6; 7.03; 68.5 and 40.5%. The two inoculants inhibited the growth of yeasts and filamentous fungi, but the commercial inoculant was the most efficient till the end of the process when these populations were bellow the minimum detection level (2.0 log cfu/g). Inoculation influenced the profile of volatile fatty acid production, but at the end of the process, the silages without any inoculant presented increased concentration of lactic and acetic acids and lower of propionic and butyric acids. The silages showed high pH values and concentrations of ammonium nitrogen and butyric acid. As soon as the silos were opened, modifications in the silages were found, with increases in the populations of LAB, yeasts and filamentous fungi. Also, increase of the pH values resulting from the reduction of the concentration of organic acids, increases of the contents of DM and CP were also verified. The addition of *L.buchneri* to the silages improved their stability, there being no heating throughout the evaluated period, which was a consequence of an association of high concentration of acetic acid, associated with propionic acid and lower concentration of lactic acid at the moment of silo-opening.

## 1 INTRODUÇÃO

A gramíneas do gênero *Panicum* são indicadas para a conservação por meio da ensilagem como forma de aproveitar o excedente de forragem produzido na época das chuvas. Segundo Pereira et al. (2006), a utilização da forragem por meio do pastejo é a forma mais barata de suplementação para os animais, cujo custo corresponde a cerca de metade daquele requerido para a conservação de forragens. No entanto, em decorrência da estacionalidade de produção das forrageiras, que faz com que na maioria das regiões pastoris do Brasil ocorra a disponibilidade de boa forragem apenas por seis meses, agravada pela desuniformidade do pasto decorrente do pastejo, torna-se altamente interessante a prática de conservação do excedente de produção.

O capim-mombaça (*Panicum maximum* Jacq. Cv Mombaça) é uma das cultivares mais produtivas do gênero *Panicum*, sendo muito utilizada para pastejo em função das boas respostas à adubação nitrogenada e à alta capacidade suporte da pastagem (Jank, 1995). É uma cultivar de alta produtividade, produzindo 165 t/ha ano de matéria verde, e tem elevada porcentagem de folhas no ano (86,9%). Os teores de proteína bruta (PB) nas folhas e nos colmos, obtidos na avaliação do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC) EMBRAPA, foram de 13,4 e 9,7%, respectivamente (Savidan, 1990).

Para que se possa produzir uma silagem de boa qualidade de uma forrageira, esta deve atender alguns requisitos, tais como teor de MS adequado no momento da ensilagem (30 a 35%); alta concentração de carboidratos solúveis (CHOs) e baixo poder tampão (PT). As gramíneas de clima tropical, em geral, devem ser colhidas no estágio mais jovem de desenvolvimento para que forneçam alimento de melhor valor nutritivo. Neste estágio as plantas apresentam baixos teores de MS e de CHOs. No entanto, estudos mostraram que as gramíneas do gênero *Panicum* não apresentam limitações ao processo de



ensilagem, uma vez que os teores de MS, CHOs e poder tampão não foram limitantes ao processo fermentativo, comprovado pelos baixos teores de nitrogênio amoniacal apresentados pelas silagens (Coan, 2000; Ávila, 2002).

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem que gramíneas do gênero *Panicum* possam ser ensiladas sem aditivos, tem sido observado que estes podem melhorar a qualidade do processo fermentativo. Dentre os inúmeros aditivos disponíveis, os inoculantes microbianos são classificados como estimulantes de fermentação (McDonald et al., 1991). Estes constituem um dos grupos de aditivos mais utilizados em todo o mundo pela segurança e facilidade de uso, além de não serem corrosivos para o maquinário, não poluírem o meio ambiente e serem produtos naturais. Diante disso, existe um grande número de estudos relacionados ao uso de inoculantes em silagens; no entanto, os resultados ainda são contraditórios em relação à melhoria no processo fermentativo, valor nutritivo, digestibilidade das silagens, consumo de MS e ganho de peso dos animais.

Até alguns anos atrás, a maioria dos inoculantes microbianos existentes no mercado continham somente bactérias ácido lácticas (BAL) homofermentativas, que são mais eficiente na redução do pH, restringindo a degradação protéica e reduzindo as perdas de MS durante o processo fermentativo. Entretanto, os estudos mostraram que silagens bem preservadas apresentavam maiores problemas de deterioração aeróbia. Nos dias atuais, muitos pesquisadores têm se voltado para o estudo de cepas de BAL heterofermentativas, como a cepa *Lactobacillus buchneri*. Estas bactérias produzem maior concentração de ácido acético em relação ao ácido láctico, sendo este um ácido eficiente para inibir o crescimento de leveduras, que são as principais iniciadoras do processo de deterioração das silagens (McDonald et al., 1991).

Vários trabalhos conduzidos com a utilização de *L. buchneri* têm demonstrado que as silagens inoculadas apresentaram maior teor de ácido acético, menor contagem de leveduras, maiores valores de pH e, principalmente, maior estabilidade aeróbia, sem influenciar negativamente o consumo e a digestibilidade das silagens (Driehuis et al., 1999; Filya et al., 2002; Kung et al., 2001).

Apesar de o efeito positivo da adição de *L. buchneri* ser mais pronunciado durante a fase aeróbia, torna-se necessário conhecer quais modificações ocorrem durante o processo de fermentação de silagens inoculadas com esses microrganismos. Em silagens de gramíneas, nas quais a concentração de CHOs em geral é baixa, a adição desses microrganismos é feita com o intuito de aumentar a competição pelas BAL em relação a outros microrganismos deterioradores, melhorando a qualidade fermentativa e sanitária das silagens. Como essas são bactérias heteroláticas, pretende-se associar a essa característica um maior efeito durante a fase aeróbia, aumentando a estabilidade aeróbia das silagens.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de duas cepas de *L. buchneri*, uma proveniente de um inoculante comercial e outra isolada da silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), sobre o perfil de fermentação e, também, sobre as variações ocorridas após a abertura dos silos das silagens de capim-mombaça.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local e período**

O experimento foi conduzido nos Departamentos de Zootecnia e Biologia da Universidade Federal de Lavras – MG.

A Estação Climatológica Municipal de Lavras, MG, está situada no Campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, Estado de Minas Gerais, em convênio com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMER), a latitude de 21°14' S, longitude de 45°00' W e altitude de 918,84 m (Brasil, 1992). Segundo classificação internacional de Köppen, o clima da região é do tipo Cwa, subtropical com verão quente e chuvoso e inverno frio e seco, caracterizado por um total de 23,4 mm de chuvas no mês mais seco e 295,8 mm no mês mais chuvoso, precipitação total anual de 1.529,7 mm e temperaturas médias máxima mensal igual a 22,1 em fevereiro e mínima mensal igual a 15,8°C em julho.

### **2.2 Delineamento Experimental e Tratamentos**

O experimento para avaliação do perfil de fermentação das silagens de capim-mombaça foi conduzido obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, e os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3 x 5, sendo três silagens (sem inoculante; com inoculantes experimental e com inoculante comercial) e cinco tempos de abertura dos silos (0, 3, 10, 30, 60 e 90 dias de fermentação). Os dados foram analisados estatisticamente pelos procedimentos de análise de variância para os experimentos fatoriais. Aqueles de natureza qualitativa foram comparados por meio do teste Scott-Knott, e os de

natureza quantitativa foram submetidos ao estudo de regressão. O modelo linear estatístico utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

$Y_{ijk}$  é o valor observado na k-ésima repetição do j-ésimo tempo e do i-ésimo inoculante;

$\mu$  é uma constante inerente a todas as observações;

$a_i$  é o efeito do i-ésimo inoculante ( $i = 1,2,3$ );

$b_j$  é o efeito do j-ésimo tempo de abertura ( $j = 1,2,3,4,5,6$ );

$ab_{ij}$  é o efeito da interação entre o i-ésimo inoculante com o j-ésimo tempo de abertura;

$e_{ijk}$  é o erro associado à observação  $Y_{ijk}$ , considerado independente com média igual a zero e variância constante.

O experimento para avaliação da estabilidade aeróbia das silagens também foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo os fatores dispostos em esquema de parcelas subdivididas no tempo, com as silagens (sem inoculantes, com inoculante experimental e com inoculantes comercial) dispostas nas parcelas e os tempos de avaliação 0, 2, 6 e 10 dias após abertura dos silos nas subparcelas. O modelo linear utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + e_{j(i)} + d_k + e_{jk} + ad_{ik} + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

$Y_{ijk}$  é o valor observado na k-ésima repetição do j-ésimo tempo e do i-ésimo inoculante;

$\mu$  é uma constante inerente a todas as observações;

$a_i$  é o efeito do i-ésimo inoculante (tratamento da parcela);

$e_{j(i)}$  é o erro experimental associado à parcela;

$d_k$  é o efeito do k-ésimo dia de avaliação (tratamento da subparcela);

$e_{j(k)}$  = erro associado aos tratamentos da subparcela (dias);

$ad_{ik}$  é o efeito da interação entre o  $i$ -ésimo inoculante com o  $k$ -ésimo dia de avaliação;

$e_{ijk}$  é o erro associado à observação  $Y_{ijk}$ , considerado independente, com média igual a zero e variância constante.

### **2.3 Preparo da forragem para ensilagem**

Foi utilizada uma área de capim-mombaça (*Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça) já estabelecida. Com base na análise química do solo foi feita a correção da acidez, após um corte de uniformização, para elevar a saturação por bases para 60%. Em janeiro de 2006 foi feito um corte de uniformização com roçadeira costal a uma altura de aproximadamente 20 cm do nível do solo, seguido da adubação conforme recomendação da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (1999). Após 60-65 dias de rebrota, a forragem foi colhida com roçadeira costal e picada em máquina estacionária, proporcionando partículas de 10 a 30 mm para a ensilagem.

### **2.4 Preparo dos inoculantes**

Os inoculantes foram previamente preparados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFLA. O inoculante experimental consistiu da bactéria *Lactobacillus buchneri*, isolada de uma silagem de cana-de-açúcar como especificado no Capítulo 2. Já o inoculante comercial empregado foi o inoculante Pioneer 11A44TM (Pioneer Hi-Bred International, Inc., Des Moines, IA, USA), que contém a bactéria *L. buchneri* na concentração  $10^{11}$  ufc/g do produto.

O inoculante comercial foi adicionado de acordo com a recomendação do fabricante de 8 log ufc/kg ou 5 log ufc/g de forragem. Para tanto, foi pesado 0,003g do inoculante, o qual foi misturado com 80 ml de água destilada estéril e, posteriormente, borrifado sobre a forragem no momento da ensilagem.

Para que ambos fôssem adicionados com a mesma concentração de células viáveis, foi feita a contagem do número destas no inoculante experimental através de plaqueamento em meio MRS (Tabela 15A). Inicialmente o microrganismo foi cultivado em tubos contendo 2 ml de caldo MRS por 24 horas; em seguida, foi transferido para tubos contendo 10 ml de caldo MRS por mais 24 horas e, finalmente, transferido para erlenmeyer com 250 ml de caldo MRS e cultivado por 24 horas. Após este tempo, foi feita a contagem do número de células, obtendo-se um resultado de 9 log ufc/ml do caldo. Para cada silo foi retirado, então, 0,3 ml do caldo presente no erlenmeyer, o qual foi, posteriormente, misturado com 80 ml de água destilada estéril e borrifado sobre 3kg de forragem para ser ensilada. Ao final, o inoculante experimental foi inoculado em uma concentração de 8 log ugc/kg de forragem, que corresponde a 5 log ufc/g de forragem.

## **2.5 Preparo das silagens e formação dos tratamentos**

A forragem picada foi ensilada em silos de PVC com diâmetro de 10 cm e altura de 80 cm, adaptados com válvula tipo Bunsen, com capacidade para aproximadamente 2,5 a 3 kg de forragem, sendo utilizada uma densidade de compactação de aproximadamente 600 kg de forragem por m<sup>3</sup>.

Os inoculantes preparados anteriormente foram misturados à forragem no momento da ensilagem, com auxílio de um borrifador (sendo um para cada tratamento). Teve-se o cuidado de adicionar à testemunha somente água

destilada estéril, na mesma quantidade de água que foi adicionada junto com os inoculantes (80 ml).

A forragem foi compactada manualmente nos silos, com barra de ferro, os quais foram armazenados com a válvula voltada para baixo (para que o efluente produzido fosse eliminado), em temperatura ambiente e sob a proteção da luz solar e chuvas. Foram retiradas amostras da forragem fresca, sem e com inoculantes, das quais uma parte foi encaminhada para o freezer e outra, para a estufa de ventilação forçada a 65°C, por 72 horas, moída e armazenada para análises posteriores. Uma terceira amostra foi colhida para contagem da população de microrganismos e leitura do pH. A forragem foi compactada manualmente nos silos, com barra de ferro, os quais foram armazenados com a válvula voltada para baixo (para que o efluente produzido fosse eliminado), em temperatura ambiente e sob a proteção da luz solar e chuvas.

## **2.6 Avaliação do perfil de fermentação das silagens**

Para a avaliação do perfil de fermentação das silagens, os silos foram abertos com 0, 3, 10, 30, 60 e 90 dias de fermentação e de cada silo foram retiradas duas amostras, tomando-se o cuidado de desprezar as silagens das extremidades dos silos. Destas amostras, uma foi pesada e seca em estufa de ventilação forçada a 65°C e a outra foi colocada em sacos plásticos devidamente identificados e congelados. No momento da abertura de cada silo foi retirada uma terceira amostra para determinação do pH e contagem da população de microrganismos.

As análises bromatológicas da forragem fresca e das silagens foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Animal do DZO-UFLA. As amostras secas foram moídas em moinho do tipo Willey, com peneira de 30 mesh, e

armazenadas em potes plásticos devidamente identificados e encaminhados ao laboratório para a determinação dos teores de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) conforme os métodos recomendados pela AOAC (1990); fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) segundo as técnicas descritas por Silva (1990); e teor de hemicelulose pela diferença entre FDN e FDA.

O teor de carboidratos solúveis (CHOs) também foi determinado com amostra seca, conforme a técnica de Bailey (1977) modificada por Valadares Filho (1981). O princípio do método consiste na extração dos carboidratos com solução alcoólica a 80%, reação com solução ácida preparada com antrona e posterior leitura em Espectrofotômetro, utilizando solução de glicose para o preparo da curva padrão.

Das amostras congeladas extraiu-se o suco, com prensa hidráulica, para a determinação do teor de nitrogênio amoniacal como percentagem do nitrogênio total [N-NH<sub>3</sub>(% N total)], ácidos graxos voláteis e ácido láctico por cromatografia gasosa (AOAC, 1980). Para análise cromatográfica foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu GC17a; Coluna capilar (30m x 0,025mm), com temperatura inicial de 90°C e final de 180°C, pressão de 22 e fluxo de 20 mais detalhado (AOAC, 1980)

O poder tampão foi determinado somente para a forragem não ensilada (tempo 0), utilizando amostras congeladas, de acordo com a técnica descrita por Playne & McDonald (1966). Para tanto foram pesados 15 g de amostra do material fresco, os quais foram macerados em liquidificador com 250 ml de água destilada. O macerado foi titulado primeiramente para pH 3,0, com HCl 0,1N para liberar bicarbonatos e CO<sup>2</sup> e, em seguida, titulado para pH 6,0 com NaOH 0,1N. A capacidade tampão é expressa como equivalente miligrama (e.mg) de ácidos requeridos para mudar o pH de 4,0 para 6,0, por 100 g de MS, após correção para o valor da titulação de 250 ml de água. Com base nos teores de



carboidratos solúveis, MS e do poder tampão, foi calculado o coeficiente de fermentação (CF) do capim-mombaça e da cana-de-açúcar segundo Weissback & Honig (1996), citado por Oude Elferink (2000).

Da terceira amostra coletada foi retirada uma subamostra de 80 g, a qual, a seguir, foi misturada com água peptonada estéril e encaminhada imediatamente ao Laboratório de Microbiologia para a avaliação da população de fungos filamentosos, leveduras e bactérias do ácido láctico (BAL). Foi coletada também uma subamostra de 10 g de silagem para se proceder à leitura do pH por meio de um potenciômetro Beckman Expandomatic SS-2.

As análises microbiológicas da forragem e das silagens foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da UFLA. Foram efetuadas as contagens de BAL, leveduras e fungos filamentosos em todos os tempos de abertura dos silos. Foi coletada uma subamostra de 80 g de silagem de cada silo, colocada, assepticamente, em frascos contendo 720ml de água peptonada estéril (1% de peptona), esterilizada a 121°C/15 min.) e agitada durante 20 minutos. A partir do extrato obtido foram preparadas diluições decimais de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .

As contagens totais de BAL, leveduras e fungos filamentosos foram realizadas tomando-se 0,1 ml de cada diluição, em triplicata, espalhado com alça de Drigalsky no meio MRS (Tabela 15 A) e acrescido de nistatina (0,4%) para contagem de bactérias ácido lácticas; meio DRBC (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol) (Tabela 15A) para a contagem de fungos filamentosos e meio YEPG (Tabela 15A) para a contagem de leveduras. As placas foram incubadas a 28°C e a contagem total de bactérias foi realizada após 24-72 horas de incubação. Para a contagem de fungos filamentosos e leveduras, as placas foram incubadas por 24 a 72 horas.

Os dados foram analisados estatisticamente pelos procedimentos de análise de variância para os experimentos fatoriais, utilizando o programa SISVAR (Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados) (Ferreira,

2000), de acordo com o esquema de variância mostrado nas tabelas em anexo (Tabelas 1A a 14A). Quando os tratamentos foram significativos, foi feita comparação múltipla utilizando o teste de Scott-Knott (no caso de comparação entre as silagens) ou usando regressão quando os tratamentos eram de natureza quantitativa, como no caso dos tempos de abertura dos silos. Para os tempos de abertura dos silos, em decorrência do tipo de comportamento utilizaram-se modelos mais complexos, com graus superiores a três, visto que, em alguns casos, modelos mais simples não foram hábeis em representar as modificações temporais ocorridas ao longo do processo de fermentação.

## **2.7 Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens**

O experimento para avaliação da estabilidade aeróbia foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, com os tratamentos dispostos em esquema de parcelas subdivididas no tempo, sendo os dias de avaliação considerados como subparcela no tempo com as três silagens (silagens sem inoculantes, com inoculante experimental e comercial) nas parcelas e quatro tempos de avaliação aeróbica das silagens (0, 2, 6, e 10 dias após a abertura dos silos), considerados como tratamentos da subparcela no tempo.

Após um período de ensilagem de 90 dias, os silos foram abertos e de cada silo foi retirada uma amostra de cerca de 3,0 kg, que foi acondicionada em baldes plásticos de aproximadamente 5,0 kg cada para avaliação da estabilidade aeróbia. Essas amostras ficaram em uma sala fechada e a temperatura de cada amostra foi monitorada diariamente. Para isto, um termômetro foi inserido na massa ensilada, numa profundidade de 10 cm, durante 10 dias. A temperatura da massa ensilada foi tomada duas vezes ao dia, às 8:00 e às 17:00 horas, e a temperatura ambiente foi medida com o auxílio de um termômetro localizado

próximo aos baldes. A estabilidade aeróbia foi calculada como sendo o tempo em horas observado para que o alimento volumoso, após a abertura do silo, apresentasse elevação da temperatura em 2°C em relação à temperatura ambiente (Kung Jr. et al.,2000), que apresentou média de 20,5°C e variação entre 19 e 21°C. Também foi efetuado um estudo de regressão das temperaturas das silagens durante o período de cinco dias.

Durante esse período, nos dias 0, 2, 6, e 10 foram retiradas amostras para a realização das análises laboratoriais. Destas amostras, uma parte foi colocada em sacos plásticos devidamente identificados e congelados para as determinações das concentrações de AGV, ácido láctico e nitrogênio amoniacal. A outra parte foi colocada em água peptonada estéril e encaminhada, imediatamente, ao Laboratório de Microbiologia para as avaliação das populações de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. No momento da abertura de cada silo foi retirada uma amostra de 10 g de silagem para se proceder à leitura do pH através de um potenciômetro Beckman Expandomatic SS-2. Uma terceira amostra coletada foi pesada, seca em estufa de ventilação forçada a 65°C e, posteriormente, moída em moinho do tipo Willey, com peneira de 30 mesh, armazenada em potes plásticos devidamente identificados e encaminhada ao laboratório para a determinação dos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e carboidratos solúveis (CHOs). Todas as análises químicas, bromatológicas e microbiológicas realizadas durante a avaliação da estabilidade aeróbia foram feitas utilizando as mesmas técnicas utilizadas durante a avaliação do perfil de fermentação citadas no item anterior

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Composição química da forragem do capim-mombaça antes da ensilagem

A adição do inoculante *L. buchneri* não influenciou a composição química do capim-mombaça antes da ensilagem (Tabela 1).

**TABELA 1** – Composição química e coeficiente fermentativo (CF) do capim-mombaça antes da ensilagem, sem inoculante (1), com inoculante experimental (2) e com inoculante comercial (3)

Silagens	MS	PB	FDN (%)	FDA	HEM	CHO (g/kg)	pH	PT Emg NaOH/ 100g MS	CF
1	28,0a	7,8a	77,9a	50,0a	30,6b	25,3a	5,3a	24,3	34,8
2	28,3a	7,5a	77,9a	43,2c	35,0a	24,1a	5,8a	22,8	36,2
3	28,2a	7,7a	78,6a	46,7b	32,0b	26,6a	5,8a	21,9	38,2

<sup>1</sup> Teores de matéria seca (MS); proteína bruta (PB); fibra em detergente neutro (FDN); fibra em detergente ácido (FDA); hemicelulose (HEM); carboidratos solúveis (CHOs); potencial hidrogeniônico (pH); poder tampão (PT) e coeficiente fermentativo (CF). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferenciam entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Com exceção dos valores de FDA e HEM, os valores das demais características químicas estudadas foram similares aos encontrados na literatura, com pequenas variações, mas, em geral, coerentes com os relatados para gramíneas da espécie *Panicum maximum* com 60 dias de idade. Coan et al.(2005) encontraram valores semelhantes de MS (25,1%), porém os teores de CHOs (124 g/kg de MS) e poder tampão (20,9 emg de NaOH/100 g de MS) do capim-mombaça colhido aos 60 dias foram superiores aos do presente estudo.

Os teores de CHOs, MS, bem como os valores de poder tampão, servem como parâmetros para avaliar a ensilabilidade de uma forrageira. Segundo McDonald et al. (1991), quanto menor a relação CHOs/poder tampão, maior concentração de MS é requerida para evitar fermentações indesejáveis. Em função da forte associação entre estes fatores, Weissbach & Honnig (1996),

citados por Oude Elferink (2000), propuseram uma equação que determina a capacidade fermentativa de uma forrageira. A capacidade fermentativa (CF) é calculada com base nos teores de MS e carboidratos solúveis e valores de poder tampão, sendo que valores abaixo de 35 indicam a necessidade de inclusão de aditivos à forragem para se ter uma fermentação de qualidade. Para o capim-mombaça utilizado neste experimento, a CF encontrada foi baixa, próxima ao limite inferior (35) sugerido por Weissbach & Honnig (1996). Ávila et al. (2006) encontraram, para o capim-tanzânia, CF de 38, também considerado baixo; no entanto, as silagens apresentaram qualidade satisfatória.

### **3.2 Composição química das silagens do capim-mombaça com a fermentação**

Observou-se efeito da interação inoculante x período de fermentação para as variáveis MS, FDA, HEM, CHOs e  $\text{NH}_3$  (Tabela 1 e 2A). Já as variáveis PB e FDN foram influenciadas apenas pelos tempos de abertura dos silos (Tabela 1A), enquanto o pH foi afetado por inoculante e tempo de abertura dos silos (Tabela 2A).

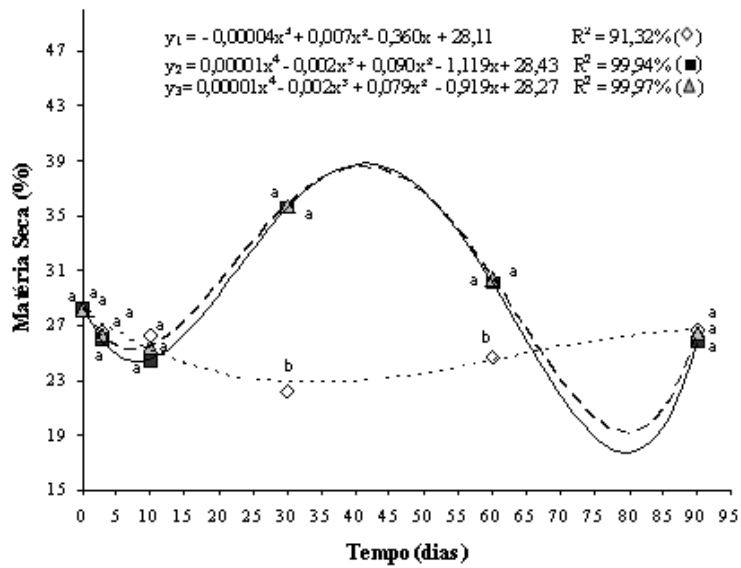
Na Figura 1 podemos observar que as variações nos teores de MS foram maiores nas silagens inoculadas, sendo que os inoculantes comercial e experimental apresentaram comportamentos semelhantes e diferentes da silagem não inoculada. Nos primeiros 10 dias de fermentação observou-se pequena redução dos teores de MS de ambas as silagens. Teores de MS mais baixos são indicativos de perda de compostos voláteis que são produzidos durante a fermentação, reduzindo, como consequência, os teores finais de MS (McDonald et al., 1991).

Entre o 10º e 40º dia houve aumento dos teores de MS nas silagens inoculadas. Uma explicação poderia ser a maior produção de efluente nessas

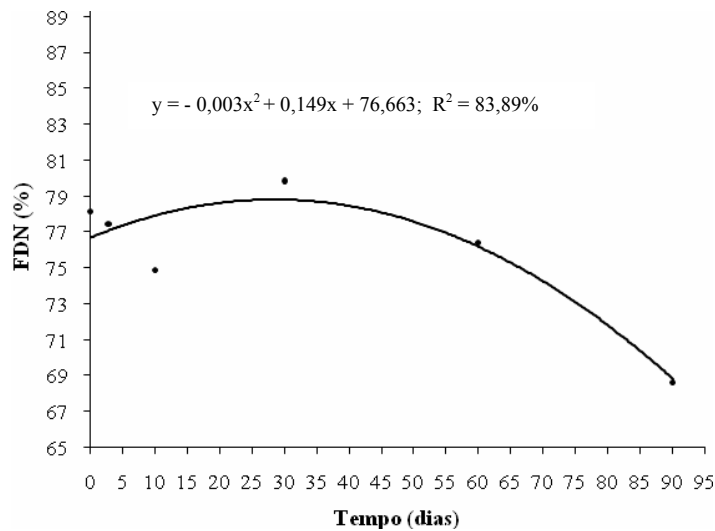
silagens. Entretanto, com os dados analisados não foi possível explicar se esse aumento foi, de fato, causado pela produção de efluentes, já que na silagem controle não se observou esse aumento de MS e não existe nenhum fator que possa ter acusado esse aumento somente nas silagens inoculadas. Pode ter ocorrido, nas silagens sem inoculante, o crescimento de outros microrganismos que causam maiores perdas de MS. Isto provocaria maior redução nos teores de MS. Contudo, em função das perdas por efluente, não se observou redução nem aumento dos teores de MS, fazendo com que, nestas silagens, os teores de MS determinados no momento de abertura dos silos variassem menos ao longo do processo. Coan et al. (2005) observaram redução de 2% nos teores de MS durante o processo de fermentação da silagem de capim-mombaça.

Os teores de FDN em função dos tempos de abertura dos silos encontram-se na Figura 2. O valor máximo estimado foi de 78,51% aos 25 dias de fermentação e, a partir daí, houve redução até aos 90 dias.

Para os teores de FDA e HEM, as silagens se comportaram de forma diferente (interação significativa entre silagens e tempo de abertura dos silos). Os teores de FDA das silagens inoculadas mostraram resposta quadrática em função dos tempos de abertura dos silos, com valores máximos de 47,78 e 49,98% aos 40 e 37 dias para as silagens com inoculante experimental e comercial, respectivamente. O teor de FDA da silagem sem inoculante decresceu 0,093% por dia de fermentação (Figura 3).



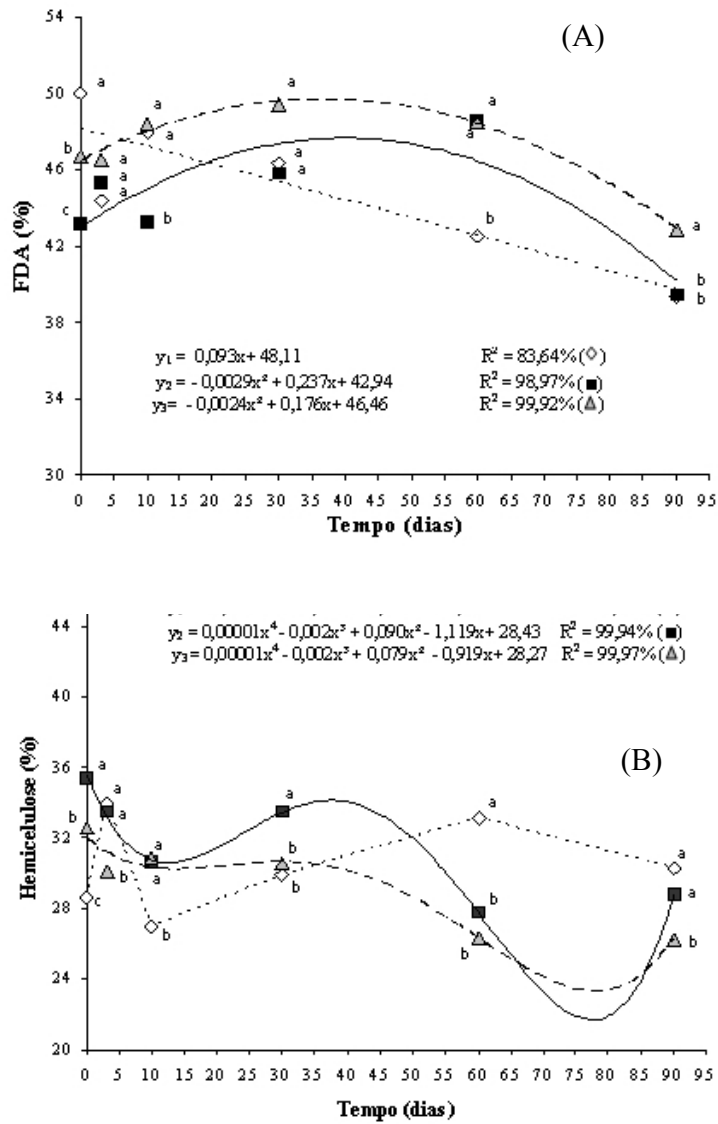
**FIGURA 1.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação dos teores de matéria seca das silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.



**FIGURA 2.** Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação dos teores de FDN das silagens de capim-mombaça (valores médios dos tratamentos) em função dos tempos de abertura dos silos.

Os teores de HEM das silagens variaram muito ao longo do processo fermentativo, sendo que cada tratamento se comportou de uma forma (interação significativa dos fatores com  $P < 0,01$ ). Para as silagens inoculadas, houve uma menor variação dos teores de HEM nos primeiros 30 dias de fermentação. Entre 30 e 80 dias foi observada uma queda mais intensa dos teores de HEM para as duas silagens, chegando, ao final do processo, a valores inferiores aos da forragem original (Figura 3). Para a silagem sem inoculante, nenhuma equação ajustou-se às modificações temporais ocorridas. No entanto, observando o comportamento dos valores médios de HEM nota-se que este foi diferente daquele das silagens inoculadas e com variações menos intensas (Figura 3).



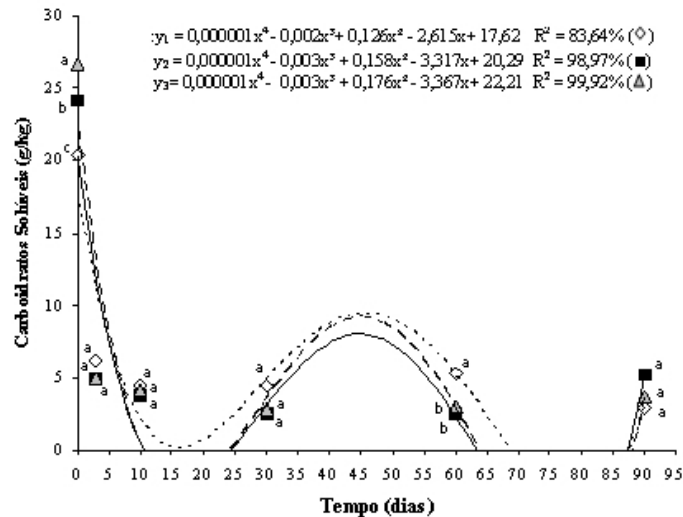


**FIGURA 3.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação dos teores de FDA (A) e hemicelulose (B) das silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.

As reduções dos teores de FDN, FDA e HEM ao longo dos 90 dias de fermentação, em relação à forragem original, foram de 9,6; 6,1 e 7,9%, respectivamente. Os carboidratos estruturais têm pequena importância como substrato no processo de fermentação. No entanto, a HEM pode atuar como reserva de açúcares através de sua hidrólise, que é, inicialmente, feita por enzimas vegetais ou microrganismos envolvidos na fermentação e, posteriormente, substituída por hidrólise ácida, quebrando as ligações químicas dos carboidratos estruturais, principalmente da hemicelulose (Winters et al., 1987). Aumentos nesses constituintes podem ser explicados pela redução do conteúdo celular, obtendo-se, assim, elevação proporcional dos mesmos, uma vez que essas análises são efetuadas por método gravimétrico. Ávila (2002), Bernardes (2006) e Pereira et al. (2001) encontraram modificações nos componentes da parede celular durante o processo de fermentação de silagens de girassol (*Helianthus annuus* L.), capim-tanzânia e capim-marandú, respectivamente.

Para os parâmetros em que houve interação entre os fatores silagens e tempos de abertura dos silos, em geral as silagens inoculadas mostraram perfis similares, porém distintos daquele da silagem testemunha. Estes resultados mostram a influência da bactéria *L. buchneri* sobre os perfis de fermentação. Entretanto, as composições químicas das silagens resultantes foram muito semelhantes.

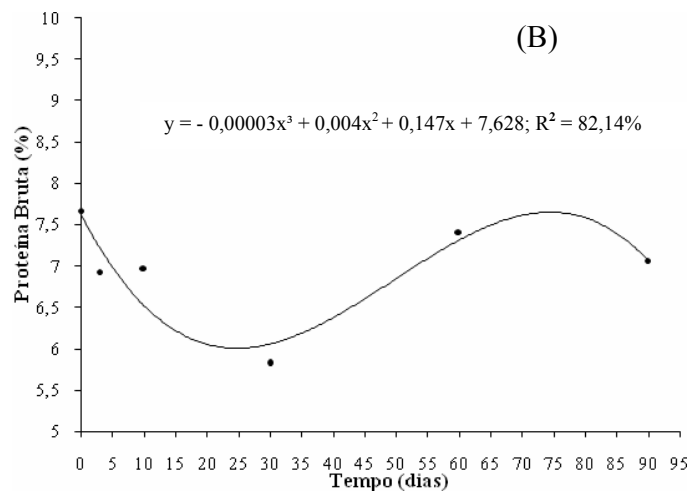
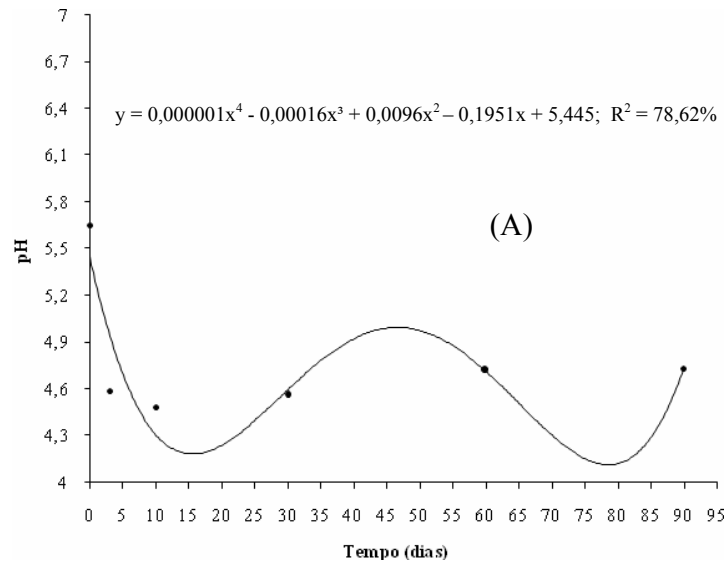
A análise estatística mostrou interação significativa ( $P < 0,01$ ) dos fatores inoculantes e tempo de abertura dos silos para as concentrações de CHOs das silagens. Na figura 4 encontra-se o comportamento dessa característica em função do período de fermentação.



**FIGURA 4.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação dos teores de CHOs das silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.

Na figura 5 encontra-se a variação de pH em função dos tempos de abertura dos silos. Observa-se, na tabela 3, que a silagem não inoculada apresentou menor ( $P < 0,05$ ) pH em relação às demais silagens. Estes valores são resultado da menor concentração de ácido lático nas silagens inoculadas (Figura 15).

A adição de inoculantes à forragem do capim-mombaça não influenciou os teores de PB das silagens em função dos tempos de abertura dos silos (Tabela 1A e Figura 5). Foi observada uma redução nos primeiros 30 dias, seguida de um aumento até aos 70 dias e, a partir daí, nova redução até aos 90 dias de fermentação (Figura 5).



**FIGURA 5.** Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação dos valores de pH (A) e PB (B) das silagens de capim-mombaça (valores médios dos tratamentos) em função dos tempos de abertura dos silos.

**TABELA 3** – Valores de pH das silagens de capim-mombaça sem inoculante e com inoculantes experimental e comercial.

Silagens	Médias
Sem inoculante	4,63 b
Experimental	4,84 a
Comercial	4,89 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ) nível de 5%.

Observou-se interação significativa ( $P < 0,01$ ) entre inoculante e tempo de abertura dos silos para a concentração de  $\text{NH}_3$  (Tabela 2A). Até aos 60 dias de fermentação, as silagens mostraram comportamentos muito similares. A partir daí houve uma maior variação, sendo que a silagem inoculada com inoculante comercial apresentou maior valor de  $\text{NH}_3$ , seguida pela testemunha e pela inoculada com inoculante experimental (Figura 6).

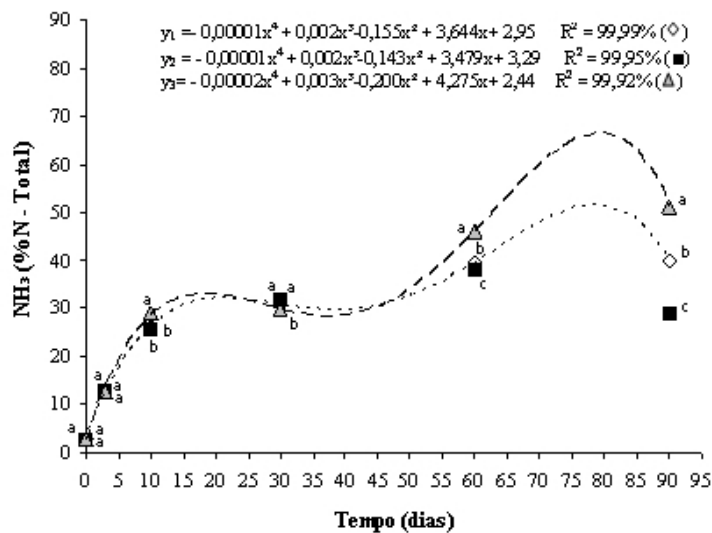
A redução inicial dos teores de PB, ocorrida nos primeiros 20 dias de ensilagem, foi associada com aumento dos teores de  $\text{NH}_3$ . Em geral existe uma correlação entre esses dois fatores, sendo a redução nos teores de PB resultado da degradação da mesma por bactérias indesejáveis, como clostrídeos ou por enzimas vegetais, produzindo aminas e amônia e, assim, causando aumento nas concentrações de  $\text{NH}_3$  (Bolsen, 1995). No entanto, a partir dos 20 dias de fermentação, aproximadamente, esta correlação não foi observada, ocorrendo aumento nos teores protéicos e estabilização das concentrações de nitrogênio amoniacal até aproximadamente 60 dias. O aumento dos teores protéicos pode estar associado à síntese de proteína microbiana.

O teor de CHOs na forragem foi muito baixo, em torno de 24 g/kg. O consumo de CHOs durante a fermentação foi superior a 80%, não havendo diferença entre os tratamentos, com recuperação média de apenas 3,9 g/kg. Essa baixa concentração de CHOs no capim-mombaça refletiu nos valores de  $\text{NH}_3$  e pH, que foram altos para todos os tratamentos. Existe uma relação entre esses fatores, de modo que quanto menos substrato há para as BAL, mais lenta é a

queda de pH e maior será a degradação protéica, pois não ocorre inibição das bactérias que degradam proteínas, como clostrídeos, e, assim, ocorrem maiores teores de  $\text{NH}_3$  (McDonald et al, 1991).

No trabalho de Coan et al. (2005), os valores de pH foram semelhantes (4,8), porém os de  $\text{NH}_3$  foram muito inferiores (7,0%). Isso resultou da concentração de CHOs inicial, que foi cinco vezes mais alta do que a encontrada no presente trabalho. Para silagens de capim-tanzânia com 25 g/kg de CHOs e 26% de MS, semelhantes às observados o para capim-mombaça neste experimento, Ávila et al. (2003) encontraram valores mais baixos de  $\text{NH}_3$  (5%) e pH (4,3), porém o poder tampão daquela forragem foi menor (15 emg de NaOH/100 g de MS).

As silagens inoculadas que apresentaram maiores valores de pH também exibiram maiores concentrações de  $\text{NH}_3$  na segunda metade do processo fermentativo. Outros autores (Driehuis et al., 2001; Fylian et al., 2003) encontraram resultados similares e em todos houve relação direta entre pH alto e maior teor de  $\text{NH}_3$ . Esses autores associaram as maiores concentrações de  $\text{NH}_3$  nas silagens inoculadas com *L. buchneri* aos maiores valores de pH.



**FIGURA 6.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação dos teores de nitrogênio amoniacal das silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.

### 3.3 Avaliação da população de BAL, levedura e fungos filamentosos

Observou-se efeito de inoculante, tempo de abertura dos silos e da interação destes para as populações de microrganismos estudadas (Tabela 3A).

A população observada de BAL, no tempo 0, foi menor na silagem testemunha (6,0 log ufc/g de forragem), como era esperado, já que esta não foi inoculada com  $10^5$  ufc/g de forragem no momento da ensilagem (Figura 7). A sua população média alcançada foi de 8,4 log ufc/g, enquanto a de leveduras foi igual à população de fungos filamentosos (6,0 log ufc/g de forragem fresca) (Tabela 4).

Cai et al. (1999) efetuaram contagens médias de cerca de 3 log ufc/g de forragem de lactobacilos, pediococos e clostrídeos; 3 a 5 log ufc/g de enterococos, leuconostoc e weissella; de 3 a 4 log ufc/g de fungos filamentosos;

4 a 5 log ufc/g de leveduras e 5 a 6 log ufc/g de bactérias aeróbias na matéria fresca de alfafa, sorgo e azevém anual.

**TABELA 4** – Valores médios da população epifítica do capim-mombaça e das silagens resultantes sem inoculantes e com inoculantes experimental e comercial.

Silagens	Forragem			Silagem		
	FF	Lev	BAL	FF	Lev	BAL
	(log ufc/g de forragem.)					
Sem inoculante	6,0a	6,0a	6,3b	4,5b	5,3c	9,0a
Experimental	5,9a	6,6a	9,2a	5,6c	4,6b	8,0b
Comercial	5,9a	5,8a	8,8a	<2,0	<2,0	8,3b

<sup>1</sup> FF= fungos filamentosos; Lev= leveduras; BAL= bactérias do ácido láctico. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Com aproximadamente 10 dias de fermentação, a população média de BAL das silagens sem inoculante se igualou àquela das silagens inoculadas (10 log ufc/g de silagem). Esse fato é comum e também foi observado em outros trabalhos. Pedroso et al. (2003) também observaram um pico da população de BAL em silagem de cana sem inoculante que foi, inicialmente, de 4,58 log ufc/g de forragem, elevando-se para 7,8 log ufc/g de silagem com 3 dias de fermentação. Whiter & Kung Jr. (2001) obtiveram contagens de BAL de 5,04 a 5,41 log ufc/g de forragem e com dois dias de ensilagem esses números elevaram-se para cerca de 9,0 log ufc/g, sem adição de inoculantes. Segundo aqueles autores, o processo de picagem tende a aumentar o número de microrganismos comparado com a cultura no campo; no entanto, esse aumento possivelmente decorre de uma quebra de dormência das células e não por inoculação efetuada pela máquina colheitadeira (Bolsen, 1995; Oude elferink et al., 2000).

Nas silagens inoculadas com inoculante experimental, a população de BAL atingiu valor máximo de 9,6 log ufc/g de silagem aos 21 dias (Figura 7).

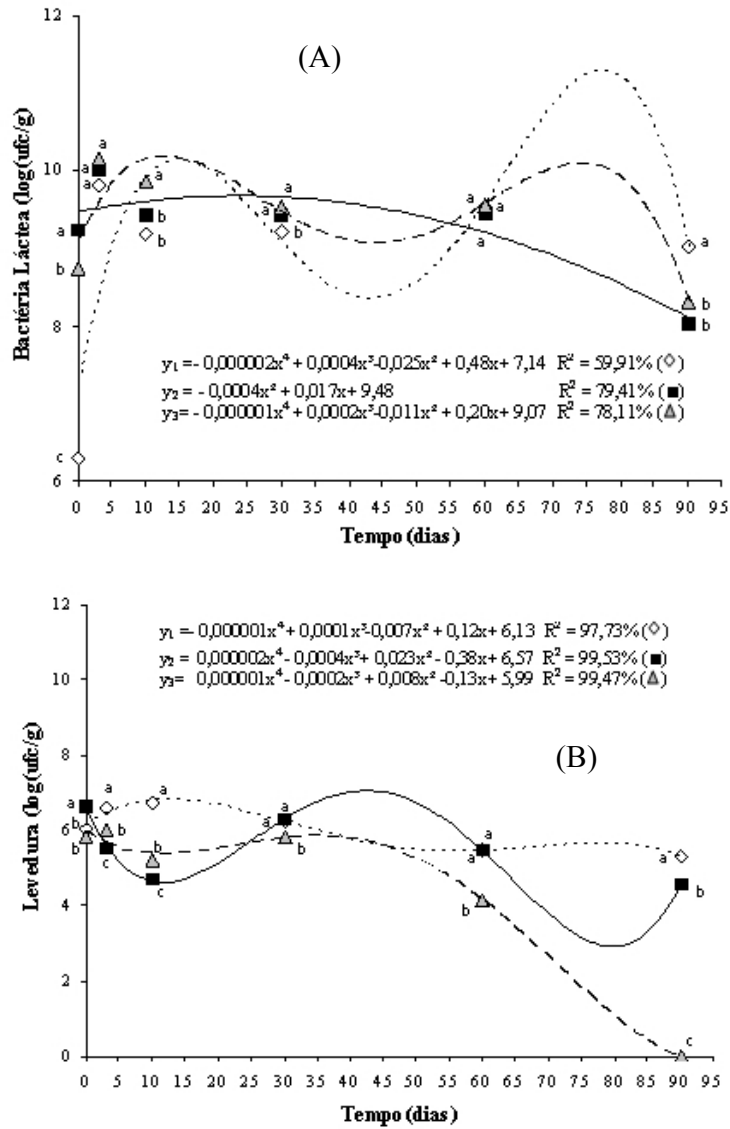
A população de leveduras variou de acordo com o inoculante durante a fermentação. Em geral, houve maior alteração da população até aos 60 dias de



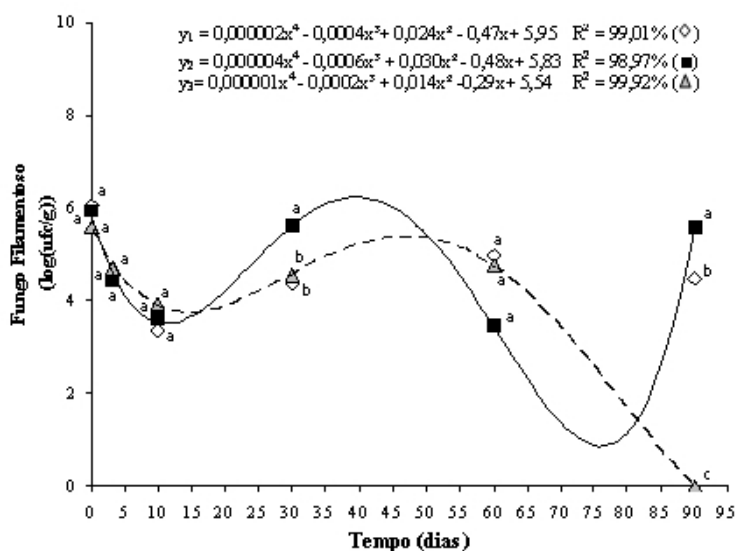
fermentação. A partir daí foi observada redução daqueles microrganismos das silagens inoculadas com inoculante comercial até o momento de abertura dos silos (90 dias), quando a população esteve abaixo do valor mínimo detectável ( $< 2,0 \log \text{ ufc/g}$ ) (Figura 7).

A população de fungos filamentosos foi muito variável durante o processo de fermentação, com queda até aos 10 dias, seguida de aumento até os 40 dias nas três silagens (Figura 8). A partir deste ponto, as silagens testemunha e inoculada com inoculante experimental apresentaram nova queda até em torno de 75 dias, sendo esta mais dramática na última e, finalmente, novo aumento. Por outro lado, na silagem inoculada com o inoculante comercial a partir dos 45 dias foi registrada uma queda na população dos fungos até aos 90 dias de fermentação, quando, nas condições avaliadas, o crescimento esteve abaixo do nível mínimo de detecção ( $< \log \text{ ufc/g}$ ) (Figura 8).

Comparando as populações dos microrganismos da forragem com as das silagens de capim-mombaça, constata-se pequena redução nas populações de leveduras e fungos filamentosos nas silagens controle e inoculada com inoculante experimental. Na silagem inoculada com inoculante comercial, o crescimento de fungos e leveduras esteve abaixo do nível mínimo de detecção, ao final dos 90 dias de fermentação (Tabela 4). Estes resultados indicam que o inoculante comercial foi eficiente em inibir os microrganismos deterioradores a partir de 50 dias de fermentação até abertura dos silos, aos 90 dias.



**FIGURA 7.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação do número de BAL (A) e leveduras (B) das silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.



**FIGURA 8.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação do número de fungos filamentosos das silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.

No momento de abertura dos silos (90 dias), as silagens com inoculante experimental apresentaram alta população de fungos filamentosos. No entanto, somente com base nesse resultado não se pode dizer que adição daquele inoculante não inibiu o crescimento dos fungos porque a sua inibição manifestou-se mais claramente dos 45 aos 75 dias. Se for observada a Figura 12, nota-se que a concentração de ácido acético na silagem com inoculante experimental foi mais alta que naquela com inoculante comercial aproximadamente dos 25 aos 55 dias. A partir daí, a concentração de ácido acético nas silagens com inoculante comercial foi mais alta. A concentração desse ácido está diretamente relacionada com a inibição de fungos filamentosos (Danner et al., 2003; McDonald, 1991). Se os silos fossem abertos aos 60 dias, seria observado um potencial de inibição semelhante para os dois inoculantes.

A população de BAL nas silagens com inoculante comercial, no terço final do processo fermentativo, foi mais alta que naquelas com inoculante experimental. Apesar de esse dado refletir a população de todas as bactérias pertencentes ao grupo do ácido lático, e não somente as bactérias da espécie *L. buchneri*, pode-se sugerir que a cepa presente no inoculante comercial foi mais ativa nos momentos finais do processo de ensilagem do que a cepa isolada da silagem de cana-de-açúcar.

Com relação à contagem de BAL, foi observado um aumento para os três tratamentos; no entanto, na silagem testemunha essa população foi mais alta, seguida pelas silagens inoculadas, que se diferenciaram entre si (Tabela 4). Em trabalhos realizados com outras forrageiras também se constatou eficiência da adição de *L. buchneri* na inibição de leveduras. Driehuis et al. (2001) encontraram resultados semelhantes avaliando silagens de azevém perene inoculadas com  $10^5$  ufc/g de *L. buchneri*, quando não foi observado crescimento de fungos filamentosos e a população de leveduras foi abaixo do nível detectável ( $<2,0$  log ufc/g) nas silagens inoculadas. Por outro lado, nas silagens controle foram efetuadas contagens de leveduras e fungos filamentosos de 4,5 e 3,8 log ufc/g de silagem, respectivamente. A população de BAL nestes trabalhos não diferenciou entre os tratamentos, com valor médio de 9,0 log ufc/g de silagem. Os autores avaliaram os mesmos tratamentos em silos de escala de fazenda e obtiveram contagens de microrganismos que seguiram a mesma tendência. Em outro trabalho com silagem da planta inteira de milho foi observada uma redução nas contagens de leveduras de 5,0 para 2,4 log ufc/g de silagem e de 4,2 para 1,8 log ufc/g de silagem, para o milho ensilado com 29 e 35% de MS, respectivamente, e nenhum efeito sobre a população de fungos filamentosos e de BAL (Filya et al., 2003).

### 3.4 Produção de ácidos graxos voláteis e ácido láctico

Houve interação significativa entre inoculantes e tempo de abertura dos silos (Tabela 4A) para os teores dos ácidos acético, propiônico, butírico e láctico durante o processo de fermentação das silagens de capim-mombaça.

**TABELA 5** – Concentração de ácidos graxos voláteis (acético, propiônico e butírico) e ácido láctico (g/100g de MS) das silagens de capim-mombaça sem inoculante e com inoculantes experimental e comercial aos 90 dias de fermentação

Silagens	Acético	Propiônico	Butírico	Láctico
Sem inoculante	3,11a	0,070b	0,706b	2,33a
Experimental	2,43b	0,089b	1,326a	0,32b
Comercial	2,98a	0,131a	1,445a	0,60b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

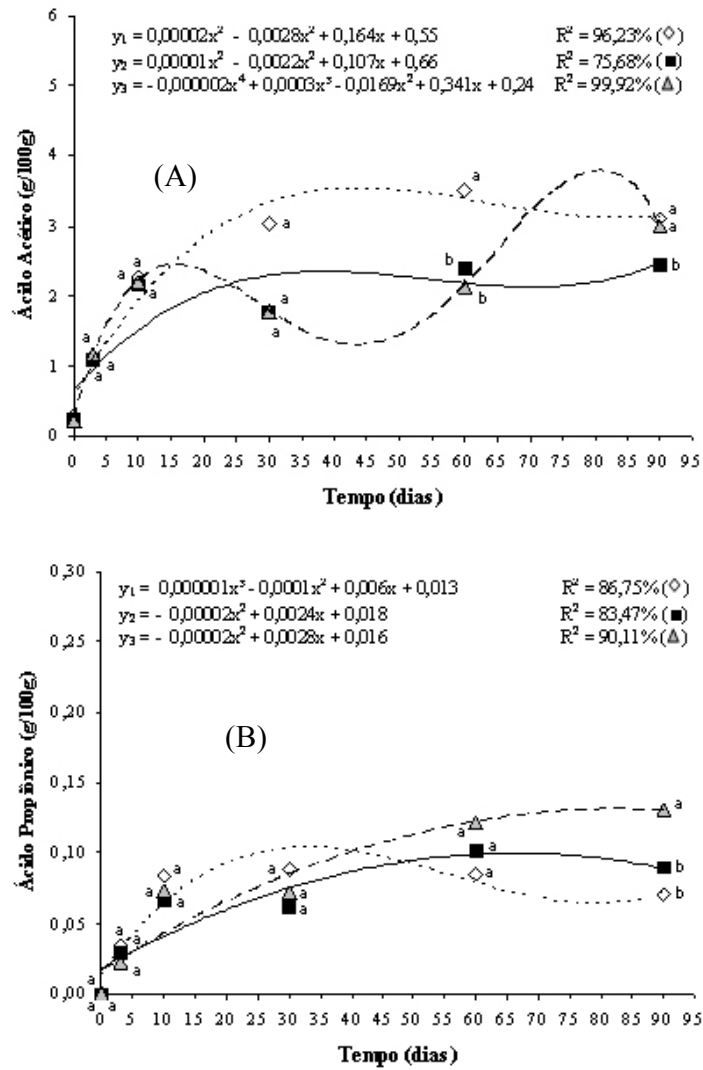
Com relação às silagens inoculadas, até por volta de 20 dias de fermentação a produção de ácido acético foi mais alta na silagem com inoculante comercial. Dos 20 aos 55 dias, aproximadamente, esse comportamento se inverte, com maiores valores para a silagem com inoculante experimental e, depois dos 55 dias, ocorre nova inversão (Figura 9). A produção de ácido acético das silagens sem inoculante e com inoculante experimental aumentou até cerca de 30 dias de fermentação e, a partir daí, notou-se tendência de estabilização até a abertura dos silos, aos 90 dias, quando as concentrações foram de 3,11 e 2,43 g/100g de MS de silagem (Figura 9). Ao final do processo, as silagens sem inoculante e inoculada com inoculante comercial apresentaram maior concentração de ácido acético do que aquela com inoculante experimental (Tabela 5).

As concentrações de ácido propiônico em todas as silagens foram baixas durante todo o processo de fermentação (Figura 9 e Tabela 5). As silagens

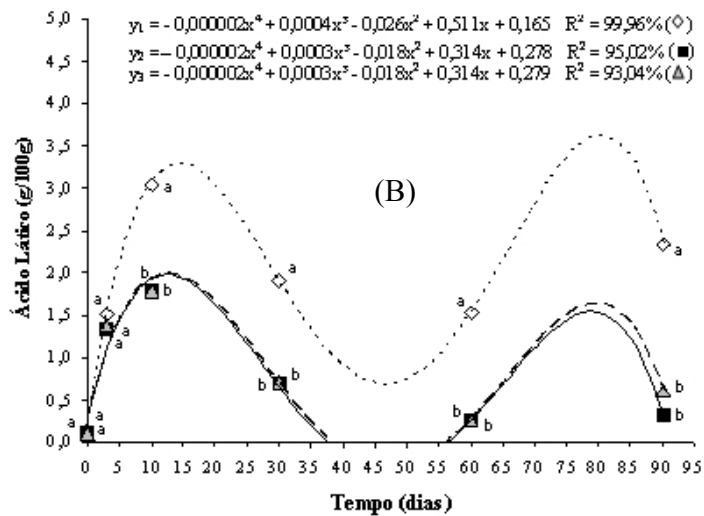
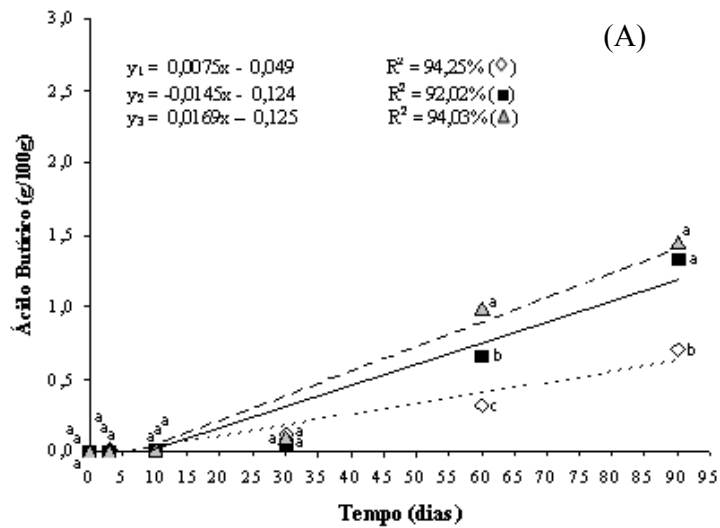
inoculadas apresentaram resposta quadrática ( $P < 0,01$ ) em função dos tempos de abertura dos silos, estimando-se valores máximos de 0,09 e 0,12 g/100 g de MS aos 60 e 70 dias, respectivamente, para as silagens com inoculante experimental e comercial. Na silagem testemunha, a concentração de ácido propiônico foi mais alta do que nas inoculadas nos primeiros 30 dias de fermentação; a partir daí houve redução na concentração deste ácido, sendo que, ao final do processo, a sua concentração foi a mais baixa (Figura 9).

Observou-se aumento linear ( $P < 0,01$ ) do ácido butírico em relação aos tempos de abertura dos silos (Figura 10). O aumento do ácido butírico ocorreu às taxas de 0,007; 0,014 e 0,017g/100g de MS por dia de fermentação, respectivamente, para as silagens sem inoculante e com os inoculantes experimental e comercial, respectivamente (Figura 10). Os principais responsáveis pela produção de ácido butírico são as bactérias do gênero *Clostridium*, sendo que a presença deste ácido é um indicativo da presença desses microrganismos, que são microrganismos indesejáveis por degradar proteínas e ácido láctico, produzindo ácido butírico, que reduz a aceitabilidade pelos animais, além de serem bactérias que podem causar doenças (Bolsen, 1995).

Com relação à produção de ácido láctico, foram observados dois picos aos 15 e 80 dias. Esse comportamento ocorreu nas três silagens, porém com valores diferentes. Nos primeiros três dias os valores foram semelhantes para as três silagens; a partir daí a silagem testemunha apresentou maiores concentrações de ácido láctico do que as inoculadas, que não diferiram entre si (Figura 10).



**FIGURA 9.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação da concentração dos ácidos acético (A) e propiônico (B) das silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.



**FIGURA 10.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação da concentração dos ácidos butírico (A) e láctico (B) das silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.



O menor teor de ácido láctico nas silagens inoculadas pode ter sido devido ao aumento proporcional de ácido acético produzido pelas bactérias heteroláticas inoculadas ou pela degradação do ácido láctico a acético por estes microrganismos. Segundo Oude-Elferink et al. (2000), as bactérias da espécie *L. buchneri* têm habilidade de metabolizar o ácido láctico a acético e 1,2-propanodiol que, posteriormente, pode ser degradado a ácido propiônico e 1-propanol por outros microrganismos presentes na silagem, como a bactéria *L. diolivorans*. Por ser mais tolerante às condições ácidas, a bactéria *L. buchneri* pode permanecer ativa durante a fase final de fermentação e, nesse caso, pode ser responsável pelo segundo pico de produção de ácido acético, como de ácido láctico, nas silagens (McDonald et al., 1991).

Driehuis et al. (2001), avaliando o perfil de fermentação de silagem de gramínea, registraram aumento dos teores de ácido láctico, dos 20 aos 40 dias de fermentação, na ausência de inoculantes. Nas silagens inoculadas com *L. buchneri* o teor de ácido láctico foi reduzindo com o decorrer do processo fermentativo, enquanto o de acético foi se elevando, o que os autores atribuem à degradação do ácido láctico a acético. Ao final do processo, encontraram-se teores de 13% de ácido láctico para a silagem controle e 4% para a silagem inoculada. Filya et al. (2003) verificaram teor menor de ácido láctico e maior de acético nas silagens inoculadas, em relação ao controle, sendo esse efeito maior com o aumento da dose do inoculante.

Ao contrário do que se tem encontrado na literatura, as silagens inoculadas apresentaram menores teores de ácido acético do que na testemunha (Figura 9). Uma explicação poderia ser a origem do ácido acético produzido durante a fermentação das silagens sem inoculantes. As enterobactérias também fermentam açúcares e produzem ácido láctico, acético e etanol como as BAL, mas o principal produto é o ácido acético (Oude Elferink et al., 2001). O pH ótimo para seu crescimento é de 6,0 a 7,0 e a maioria das cepas de

enterobacteriáceas não cresce em pH abaixo de 5,0 (Bolsen, 1995). No entanto, como nessa silagem a queda do pH não ocorreu de forma muito acelerada e o pH final foi relativamente alto (4,6), estas bactérias podem ter sido ativas no início do processo, competindo com as BAL e produzindo ácido acético do seu metabolismo. Ao final do processo de fermentação, observou-se que as silagens inoculadas apresentaram menor concentração de ácido láctico (Figura 10 e Tabela 5) e maior de ácido butírico (Figura 10 e Tabela 5).

McDonald et al. (1991) mencionam que o limite máximo de pH para a obtenção de silagens de qualidade satisfatória é igual a 4,2. No entanto, em silagens de gramíneas os valores de pH normalmente são mais elevados. Para os teores de nitrogênio amoniacal, em relação ao N total, os autores consideram a silagem como muito boa quando os valores são inferiores a 10%; aceitável, de 10 a 15%; e insatisfatória, quando os valores se situam acima de 20% (McDonald et al., 1991). Já com relação aos teores de ácidos orgânicos, segundo Woolford (1984), uma silagem de boa qualidade deve apresentar concentrações menores que 0,2% de ácido butírico. Kung Jr. (2001) definiu que em silagens de gramíneas tropicais, a proporção molar ideal dos ácidos orgânicos produzidos ao final do processo fermentativo deve ser de 6 a 10% de ácido láctico; 1 a 3% de ácido acético; menor que 0,1% de ácido propiônico e igual a 0% de ácido butírico. Em todos os tratamentos testados do presente estudo, as silagens apresentaram valores de pH, nitrogênio amoniacal e ácido butírico acima, e valores de ácido láctico abaixo, do que é recomendado para uma silagem de boa qualidade.

Os efeitos mais positivos da inoculação com *L. buchneri* são verificados durante a fase pós-abertura do silo. Em outras palavras, os resultados que, em geral, justificam a utilização do *L. buchneri* não estão relacionados com a dinâmica fermentativa. No presente trabalho, a adição de *L. buchneri*, apesar de causar modificações no perfil de fermentação, somente melhorou a qualidade

fermentativa com relação à população de fungos filamentosos e leveduras. Estes resultados irão refletir em maior estabilidade aeróbia das silagens.

### **3.5 Estabilidade aeróbia das silagens de capim-mombaça**

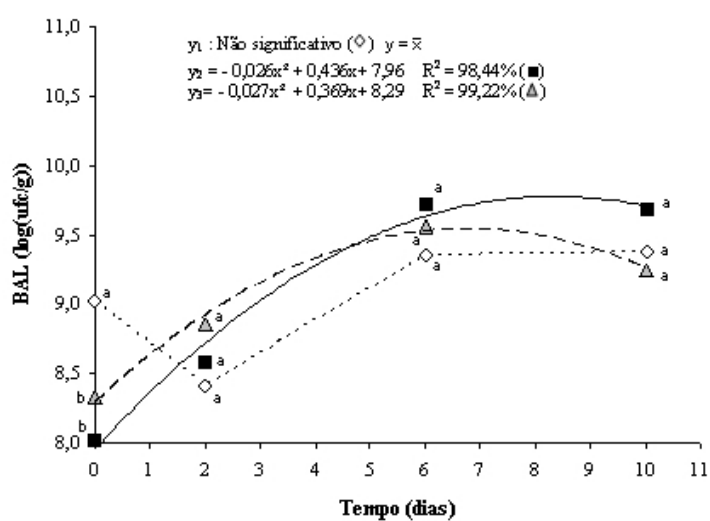
#### **3.5.1 Avaliação das populações de BAL, leveduras e fungos filamentosos**

As populações de BAL, leveduras e fungos filamentosos após a abertura dos silos foram influenciadas significativamente ( $P < 0,01$ ) pela interação inoculantes x tempos de abertura dos silos (Tabela 6A), ou seja, para cada silagem foi observado um comportamento diferente.

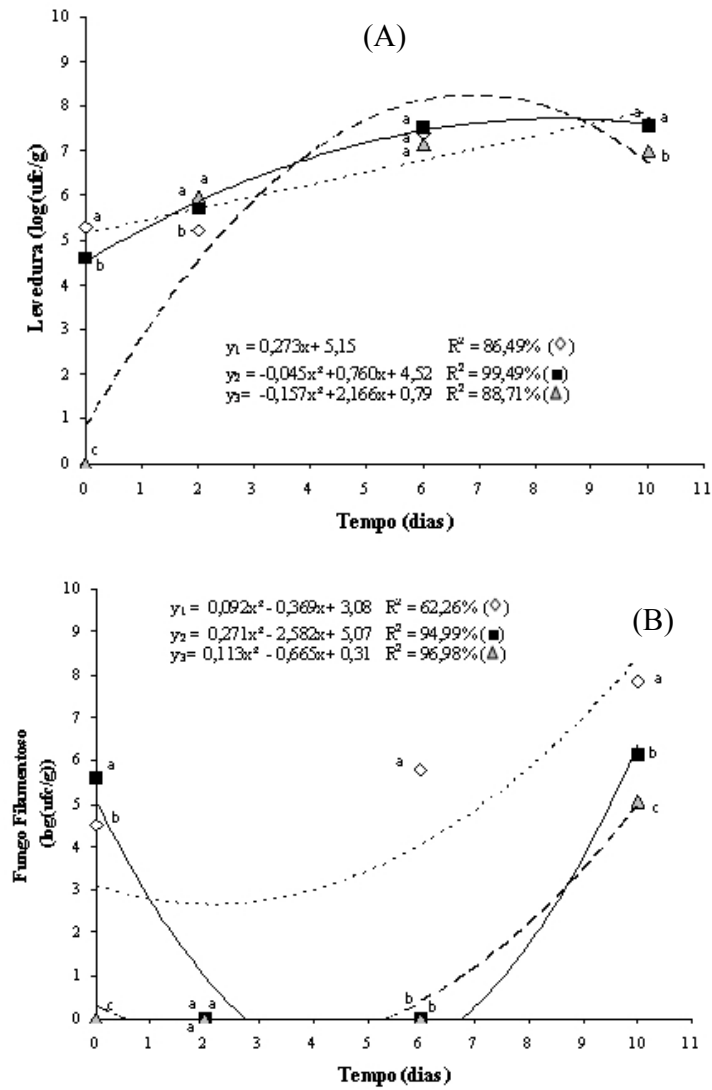
As populações de BAL nas silagens inoculadas aumentaram de forma quadrática, com valores máximos de 9,7 e 9,2 log ufc/g de silagem aos 8 e 6 dias para as silagens com inoculantes experimental e comercial, respectivamente (Figura 11). Para a silagem controle, nenhuma equação se ajustou às modificações temporais ocorridas na população de BAL após a abertura dos silos, sendo observada uma queda até dois dias de exposição ao ar e, em seguida, um aumento até seis dias, quando estabilizou (Figura 11).

No momento de abertura dos silos, as silagens testemunha e inoculada com inoculante experimental apresentaram populações de leveduras mais altas (em torno de 4,5 log ufc/g de silagem) em relação à silagem com inoculante comercial, com ausência de crescimento (Figura 12). A população de levedura da silagem controle aumentou linearmente ( $P < 0,01$ ) com o tempo de exposição ao ar. Nas silagens inoculadas, as populações destes microrganismos comportaram-se de forma quadrática em função do tempo de exposição ao ar, com valores máximos de 7,7 e 8,2 log ufc/g de silagem aos 8 e 7 dias, respectivamente, para as silagens com inoculantes experimental e comercial. (Figura 12)

As modificações ocorridas nas populações de fungos filamentosos em função do tempo de exposição ao ar mostraram comportamentos quadráticos ( $P < 0,01$ ) (Figura 12). No momento de abertura dos silos, a silagem sem inoculante e aquela com inoculante experimental proporcionaram mais altas contagens de fungos filamentosos. Com a exposição ao ar, a população destes na silagem controle alcançou uma contagem mínima de 3 log da ufc/g de silagem aos dois dias após abertura dos silos, com subsequente aumento. Nas silagens inoculadas não foi observado crescimento entre dois e seis dias de exposição ao ar, sendo que, após este tempo houve, crescimento desses microrganismos (Figura 12).



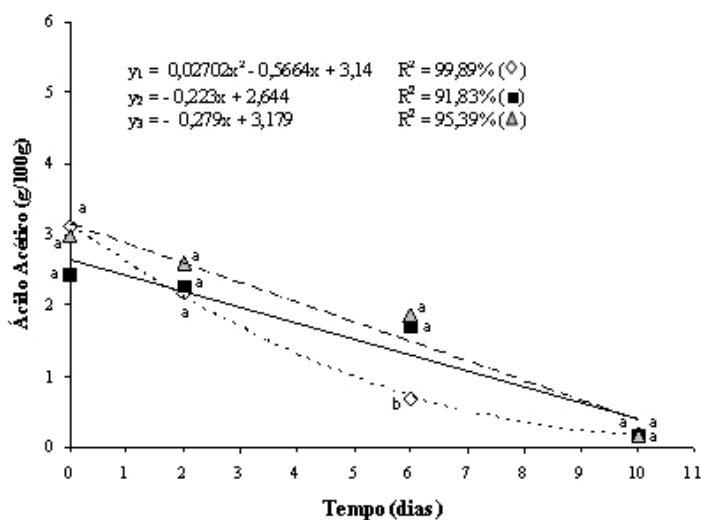
**FIGURA 11** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação do número de BAL nas silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) após a abertura dos silos.



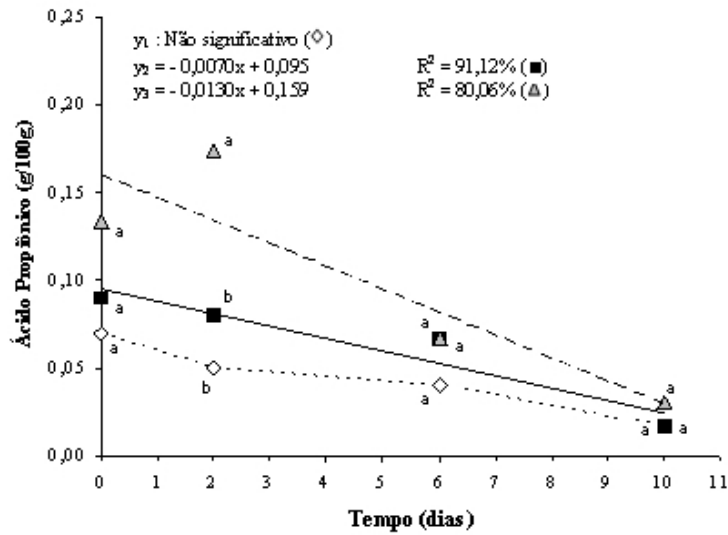
**FIGURA 12.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação do número de leveduras (A) e fungos filamentosos (B) nas silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) após a abertura dos silos.

### 3.5.2 Produção de ácidos graxos voláteis e ácido lático

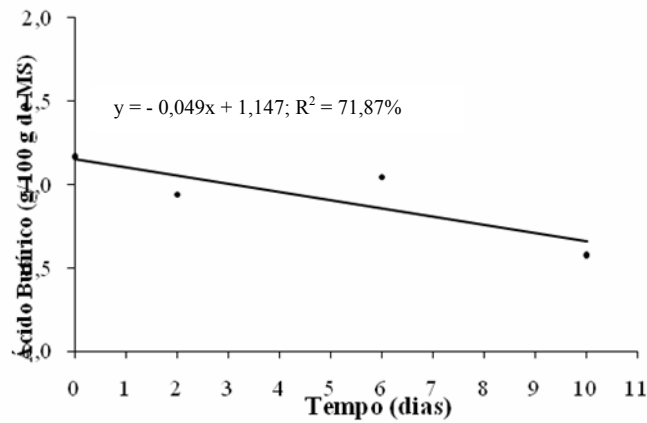
Observou-se efeito da interação inoculante x tempo para os ácidos acético, propiônico e lático. Por sua vez, o ácido butírico foi influenciado apenas por inoculante e tempo (Tabela 7A). O ácido acético decresceu linearmente ( $P < 0,01$ ) para as silagens com inoculantes experimental e comercial, enquanto a silagem testemunha se comportou de forma quadrática com o tempo de exposição ao ar (Figura 13). As concentrações de ácido propiônico e butírico decresceram de forma linear com o tempo de exposição ao ar (Figuras 14 e 15 e Tabela 7A).



**FIGURA 13.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação da concentração de ácido acético das silagens de capim-mombaça sem inoculante (Y<sub>1</sub>) e com inoculante experimental (Y<sub>2</sub>) e comercial (Y<sub>3</sub>) após a abertura dos silos.

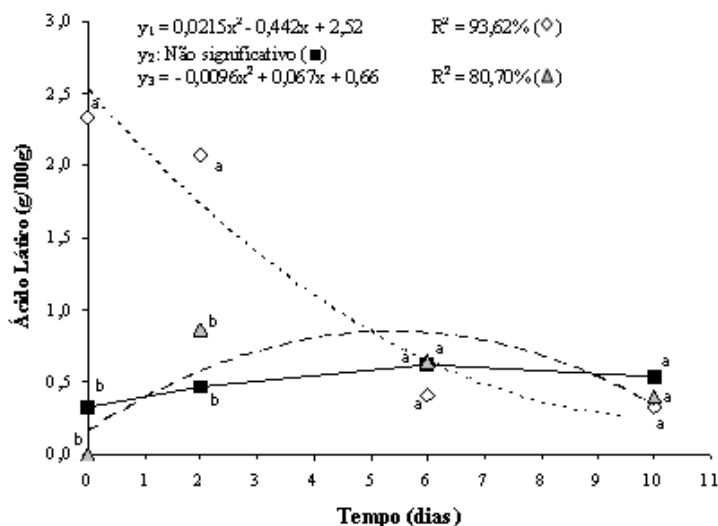


**FIGURA 14.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação da concentração de ácido propiônico das silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculante experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) após a abertura dos silos.



**FIGURA 15.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação da concentração de ácido butírico das silagens de capim-mombaça (média dos tratamentos) após a abertura dos silos.

Com relação ao ácido láctico, ajustaram-se modelos quadráticos para a silagem controle e aquela com inoculante comercial. Por outro lado, a silagem com inoculante experimental não se ajustou a nenhuma equação (Figura 16).



**FIGURA 16.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação da concentração de ácido láctico das silagens de capim-mombaça sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) após a abertura dos silos.

No presente trabalho, houve crescimento tanto de BAL quanto de leveduras e fungos filamentosos após a abertura dos silos, significando que estes microrganismos podem estar envolvidos na deterioração aeróbia das silagens. No início do processo de exposição ao ar, o crescimento de BAL e leveduras deve ter ocorrido, principalmente, às custas de produtos do metabolismo, pois a concentração de CHOs residuais era muito baixa. Isso pode ser comprovado pelas reduções nas concentrações dos ácidos acético e láctico.

O lactato pode ser metabolizado por BAL sob condições aeróbias e anaeróbias. Sob condições aeróbias, a metabolização é mediada pela enzima lactato oxidase, ou lactato desidrogenase, independente de  $NAD^+$ , em algumas



BAL, tais como *Lactobacillus curvatus*, *L. sake*, *L. casei* e *L. plantarum*, para produzir piruvato, que, posteriormente, é catabolizado (Kandler, 1983, e Murph et al., 1985, citados por Liu, 2003). A reação é a seguinte:

Lactato + O<sub>2</sub> (lactato oxidase)→piruvato (piruvato oxidase)→acetato + CO<sup>2</sup>;

Lactato + O<sub>2</sub> (lactato desidrogenase)→piruvato (piruvato oxidaes)→acetato + CO<sup>2</sup>.

Sob condições anaeróbias, como já mencionado, o lactato pode ser catabolizado pela lactato desidrogenase, independente de NAD<sup>+</sup>, por alguns lactobacilos. É o que ocorre com a espécie *L. buchneri*, que neste caso utilizou outros aceptores de elétrons, tais como shiquimato ou oxalacetato, derivado do citrato, e 3-hidroxipropionaldeído, derivado do glicerol (Axelsson, 1998; Oude-Elferink, 2001). Desta forma, as BAL também estão envolvidas na deterioração aeróbia de silagens.

Da mesma forma, sob condições aeróbias, muitas espécies de leveduras degradam o ácido láctico, causando um aumento do pH da silagem e proporcionando condições para que outros microrganismos deterioradores se desenvolvam (McDonald et al., 1991).

Os fungos filamentosos crescem melhor sob condições aeróbias e pH mais alto (5,0 a 6,0). Desta forma, quando o silo é aberto, as condições são favoráveis para o crescimento desses microrganismos que são capazes de degradar uma ampla variedade de nutrientes, inclusive carboidratos estruturais e lignina. Assim, a degradação de compostos complexos pode liberar substratos para que as BAL e leveduras continuem crescendo (Winters et al., 1987).

A população de fungos filamentosos na silagem com inoculante comercial esteve abaixo do nível detectável até os 6 dias após abertura dos silos, quando iniciou aumento (Figura 12). Apesar da alta concentração de ácido

acético no momento de abertura dos silos, esse ácido sozinho não deve ter sido responsável pela inibição do crescimento daqueles microrganismos, já que esse efeito não foi verificado na silagem com inoculante experimental nos primeiros dois dias. No entanto, verificou-se que a concentração de ácido propiônico nessa silagem foi mais alta, cerca de 0,16 g/100 g de MS do que o valor encontrado na silagem com inoculante experimental, que foi de cerca de 0,09g/100g de MS (Figura 14), podendo ser a associação entre os dois ácidos responsável pela inibição do crescimento de fungos filamentosos. O efeito dos ácidos acético e propiônico em inibir o crescimento de leveduras foi observado no trabalho conduzido por Moon (1993) com culturas *in vitro*. A partir do estudo de sinergismo entre os compostos, o autor verificou que altas concentrações de ácido láctico e baixas concentrações de ácido acético aumentaram dramaticamente o crescimento de leveduras. Além disso, a mistura dos ácidos acético e propiônico (concentração acima de 10 mM) foi, entre as misturas estudadas, a mais eficiente em reduzir a taxa de crescimento de leveduras (50% de inibição).

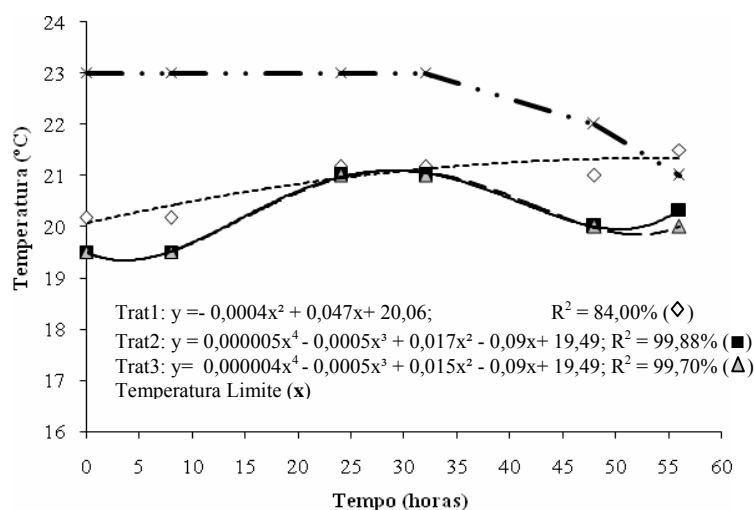
Guim et al. (2002) observaram aumento e posterior redução na população de fungos filamentosos em silagens de capim-elefante durante a exposição ao ar.

Os autores explicaram esta variação com base no ciclo de vida dos fungos filamentosos. O pH ótimo para crescimento dos fungos está entre 5-6 e a seqüência normal de reprodução é: esporo - esporo com tubo germinativo-hifa - micélio (conjunto de hifas) - órgãos de frutificação - novos esporos. Para o fungo produzir seus órgãos de frutificação pode levar de 3 a 14 dias, variando em função da espécie (Ruiz, 1992). Com base nestas informações, pode-se inferir que a contagem de fungos filamentosos na abertura dos silos, dada a ausência de O<sub>2</sub>, foi de esporos. A queda na contagem após a abertura dos silos,

até seis dias de exposição ao ar, pode ser atribuída ao próprio metabolismo desses microrganismos.

### 3.5.3 Estabilidade aeróbia com base na temperatura

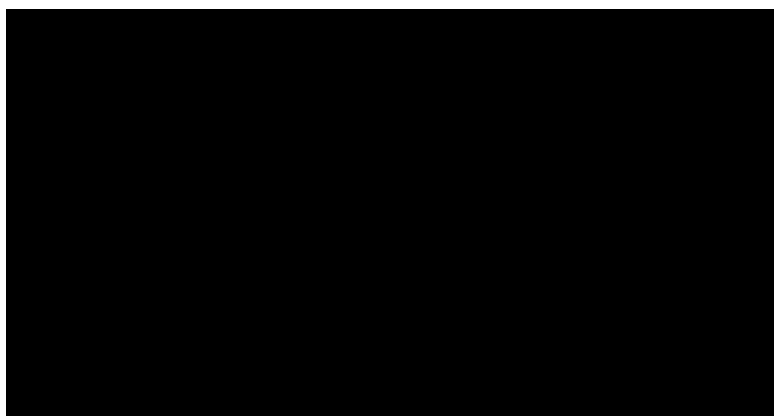
A Figura 17 ilustra o comportamento das temperaturas das silagens e da temperatura limite, considerada como sendo aquela situada a 2 graus acima da temperatura ambiente, para que as silagens percam a estabilidade aeróbica.



**FIGURA 17.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação dos valores de temperatura das silagens de capim-mombaça sem inoculante (Trat 1) e com inoculantes experimental (Trat 2) e comercial (Trat 3) após a abertura dos silos.

A silagem sem inoculante ultrapassou 2 graus acima da temperatura ambiente decorridas cerca de 58 horas; já as silagens inoculadas não ultrapassaram essa temperatura limite, mostrando que as mesmas não perderam a estabilidade dentro do intervalo de tempo estudado, que foi de 240 horas (10 dias). Esse comportamento também pode ser observado na Figura 18, que

mostra o comportamento das temperaturas das silagens submetidas aos três tratamentos durante 240 horas após a abertura dos silos.



**FIGURA 18.** Representação gráfica das diferenças entre as temperaturas dos silos e a ambiente das silagens de capim-mombaça sem inoculante (T1) e com inoculantes experimental (T2) e comercial (T 3) após a abertura dos silos.

Por meio da equação de regressão apresentada na Figura 17, mostrando o aquecimento da silagem sem aditivos, observou-se que a silagem manteve estabilidade aeróbica por cerca de 55 horas. Se esse tempo, que corresponde a 2,3 dias, for substituído nas equações que explicam o crescimento das populações de leveduras e fungos filamentosos das silagens mostradas na Figura 12, nota-se que as mesmas, naquele momento, foram, respectivamente, de 5,7 e 2,7 log da ufc/g de silagem para a silagem controle; de 6,03 e  $< 2,0$ log da ufc/g de silagem para a silagem com inoculante experimental; e de 4,94  $< 2,0$ log da ufc/g de silagem para a silagem com inoculante comercial. Com base no que já foi mencionado sobre os crescimentos de BAL e leveduras, associado a essa

informação, pode-se concluir que os fungos filamentosos foram os principais microrganismos responsáveis pela perda de estabilidade da silagem sem inoculante.

Na presente pesquisa, a adição de *L. buchneri* às silagens melhorou a sua estabilidade, sendo que não houve aquecimento durante todo o período avaliado. Esta constatação foi consequência de uma associação de resultados, ou seja, altas concentrações de ácido acético, associado ao ácido propiônico, e menor concentração de ácido lático, que serviu como substrato para o crescimento de microrganismos deterioradores. A silagem sem inoculante, apesar de ter ultrapassado a temperatura limite, não aqueceu muito, possivelmente por causa da baixa concentração de CHOs residuais. Deve-se considerar que essas silagens estudadas foram de baixa qualidade fermentativa em razão das características da forragem original, altas concentrações de NH<sub>3</sub> e ácido butírico. No entanto, em função da inibição do crescimento de fungos filamentosos e leveduras nas silagens inoculadas, e consequente aumento na estabilidade aeróbia, a adição de *L. buchneri* a estas silagens é recomendada, porém deve ser acompanhada de outros aditivos que forneçam substrato para as BAL e, assim, melhorem o seu perfil de fermentação durante a fase anaeróbica.

Outros autores também registraram aumento da estabilidade de silagens com a inoculação de *L. buchneri*. A adição de *L. buchneri*, na dose de  $3 \times 10^5$  log da ufc/g à silagem de azevém perene, aumentou a estabilidade para mais de 480 horas em comparação com a silagem controle, que foi de 183 horas (Driehuis et al., 2001). Esse efeito também foi encontrado com os mesmos tratamentos em silos de escala de fazenda, quando os resultados foram de 125 horas para controle e maior que 264 horas para silagem inoculada. Filya et al. (2003) avaliaram a estabilidade com base nos valores de pH, produção de CO<sub>2</sub>/kg de MS e contagem de leveduras e mofos após 5 dias de exposição ao ar. A adição de *L. buchneri* resultou em menor pH (4,7 contra 6,5), menor produção de CO<sub>2</sub>

(20 g/kg contra 55 g/kg) e menor contagem de leveduras (2,6 contra 6,7 log da ufc/g de silagem) em relação à silagem controle. Em nenhuma das silagens houve efeito sobre o crescimento de fungos filamentosos.

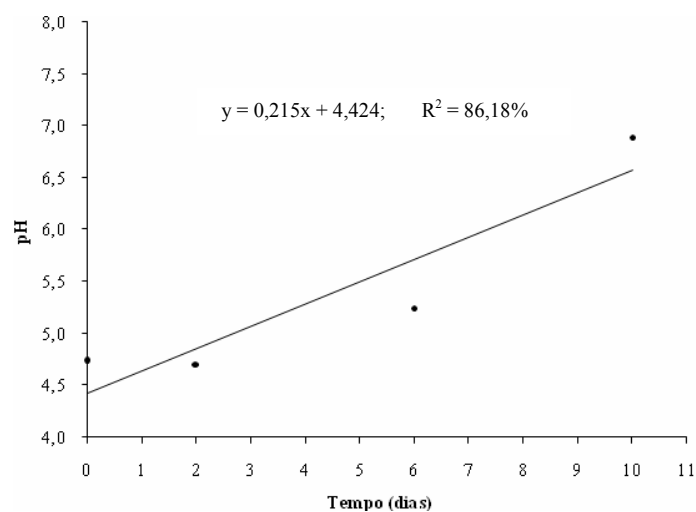
Fazendo uma comparação do efeito da adição desses mesmos inoculantes sobre a estabilidade aeróbia das silagens de cana (Capítulo 4), constata-se que apesar de estas silagens apresentarem melhor qualidade de fermentação, as silagens de capim-mombaça foram mais estáveis que as de cana. Além disso, as silagens de capim-mombaça com inoculante não aqueceram durante todo o período avaliado. Esses dados comprovam aqueles encontrados na literatura de que silagens bem preservadas deterioram mais rápido em razão das altas concentrações de carboidratos solúveis residuais e de ácido láctico, que são substratos para os microrganismos deterioradores

### **3.4 Variações na composição química das silagens durante a fase aeróbica**

Após a abertura dos silos foram observadas variações significativas ( $p < 0,01$ ) nos valores de pH e nos teores de MS e  $\text{NH}_3$  (%N-Total) das silagens (Tabela 5A). Os teores de PB não variaram ( $p > 0,05$ ) com o tempo em nenhum dos tratamentos testados. Os teores de CHOs residuais foram baixos (3,8 g/kg de MS); além disso, a análise laboratorial desta variável gerou resultados muito variáveis, com CV muito alto, e aparentemente irreais, não sendo possível uma explicação lógica para os mesmos.

Com relação aos valores de pH, os três tratamentos apresentaram comportamentos semelhantes, com aumento linear significativo ( $P < 0,01$ ) de 0,2 unidades nos valores de pH por dia (Figura 19). O aumento do pH ocorreu graças à redução dos ácidos orgânicos, que provavelmente foram utilizados no metabolismo dos microrganismos de deterioração aeróbia, como pode ser observado nas Figuras 13, 14, 15 e 16.

Para os teores de MS foi observada interação significativa ( $P < 0,01$ ) entre os fatores estudados, significando que para cada tratamento houve um comportamento distinto (Tabela 5A). Os teores de MS das silagens testemunha e inoculada com inoculante experimental aumentaram até os valores máximos de 33,38 e 30,58% aos 5 e 4 dias, respectivamente. A silagem inoculada com inoculante comercial mostrou resposta linear, com elevação de 0,6% de MS por dia (Figura 20). O aumento do teor de MS decorreu principalmente da desidratação do material que ficou 10 dias exposto ao ar. A redução dos teores de MS das silagens inoculadas a partir de 4 – 5 dias pode ser explicada pelo consumo dos CS, com conseqüente perda por gases, e pela formação da chamada “água de metabolismo” (Woolford, 1984).



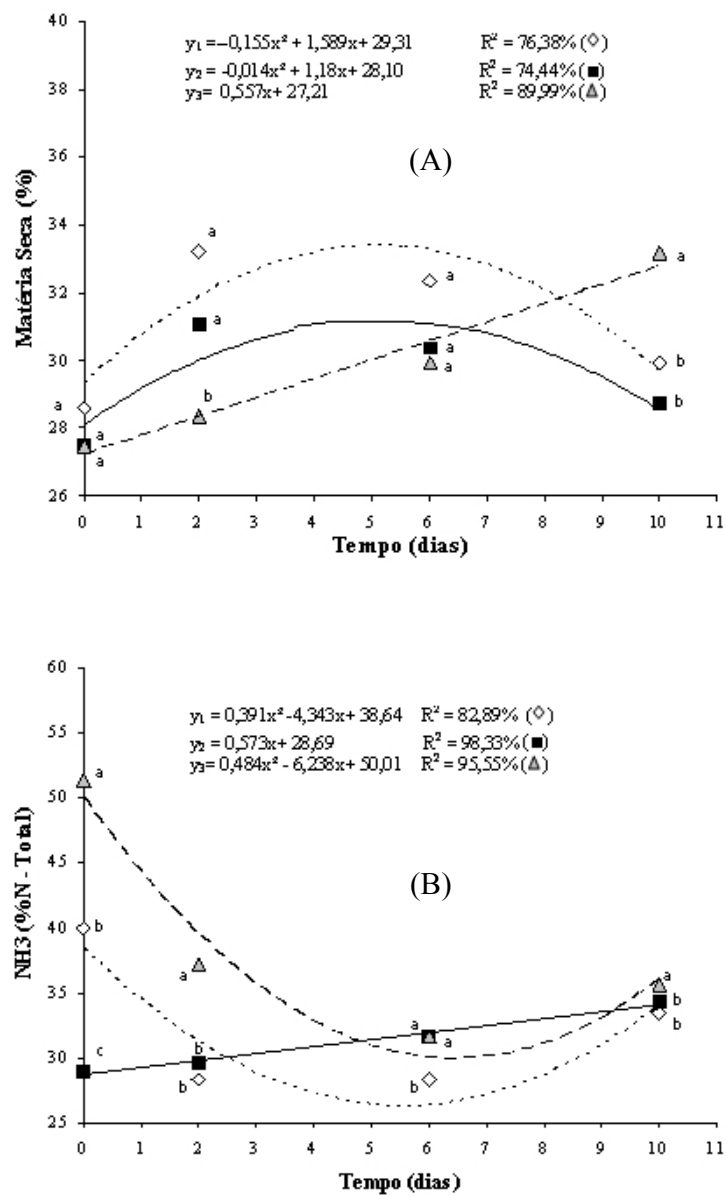
**FIGURA 19.** Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação dos valores de pH das silagens de capim-mombaça (valores médios dos tratamentos) após a abertura dos silos.

As variações nas concentrações de  $\text{NH}_3$  foram diferentes para cada tratamento (interações significativas dos fatores estudados) (Tabela 5A). As

silagens testemunha e inoculada com inoculante comercial tiveram resposta quadrática ( $P<0,01$ ) dos valores de  $\text{NH}_3$  em função do tempo, com valores mínimos de 26,6 e 30% aos 5,5 e 6,5, respectivamente, dias após a abertura dos silos. Já na silagem tratada com inoculante experimental foi observado um aumento linear ( $P<0,01$ ) de 0,6 unidades percentuais de  $\text{NH}_3$  por dia no intervalo de tempo estudado. Apesar do pequeno aumento na concentração de  $\text{NH}_3$  das silagens tratadas com inoculante experimental, não foram observados aumentos significativos deste composto nas silagens após a abertura dos silos. Ao contrário, notou-se redução da sua concentração nas silagens inoculadas, que o apresentavam em teores elevados no momento de abertura dos silos (Figura 20). Essa redução pode ser explicada pela alta volatilidade da amônia, que se perde durante a exposição ao ar.

Bernardes (2006) não observou variação na concentração  $\text{NH}_3$  na silagem de capim-marandu com a adição de *L. buchneri*, ao passo que, nos demais tratamentos, ocorreu o desaparecimento desse composto durante a exposição das silagens ao ambiente. Tavares (2005) também observou aumento do teor de PB e redução do de  $\text{NH}_3$  com a exposição ao ar, atribuído à volatilização. No trabalho de Guim et al. (2002), a redução das concentrações de  $\text{NH}_3$  após oito dias de aeração foi explicada pela ação de fungos filamentosos. Sugeriu-se que houve uma imobilização de N pelos fungos miceliares (em suas hifas), como N orgânico, após a abertura dos silos. Uma vez que a determinação do  $\text{NH}_3$  foi feita no suco da silagem, essa imobilização de N pelas hifas dos fungos filamentosos teria impedido a sua passagem para o líquido.





**FIGURA 20.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação dos teores de MS (A) e NH<sub>3</sub> (B) das silagens de capim-mombaça sem inoculante (Y<sub>1</sub>) e com inoculantes experimental (Y<sub>2</sub>) e comercial (Y<sub>3</sub>) após a abertura dos silos.

#### 4. CONCLUSÕES

A adição de inoculantes contendo bactérias heteroláticas alteram de forma semelhante o perfil fermentativo sem, no entanto, modificar a composição química da silagem resultante com 90 dias de fermentação. O inoculante comercial mostrou maior eficiência em inibir o crescimento de fungos filamentosos e leveduras.

A adição dos inoculantes experimental e comercial aumentou a estabilidade aeróbia das silagens, sendo os fungos filamentosos os principais microrganismos associados à deterioração aeróbia de silagens de capim-mombaça.

As silagens apresentaram baixa qualidade de fermentação em função da baixa concentração de carboidratos solúveis. No entanto, considerando a melhora na estabilidade aeróbia, conclui-se que este tipo de inoculante, se associado à adição de algum produto que forneça substrato para as bactérias ácido lácticas, é indicado.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. 13. ed. Washington, DC: AOAC, 1980. 1015 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. 15. ed. Virginia: AOAC, 1990. v. 1, 648 p.

ÁVILA, C. L. S. **Perfil de fermentação das silagens de capim-tanzânia com aditivos**. 2002. 82 p. Dissertação (Mestrado em Forragicultura e Pastagens) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; TAVARES, V. B.; SANTOS, I. A. Avaliação dos conteúdos de carboidratos solúveis do capim-tanzânia ensilado com aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 648-654, maio/jun. 2006

AXELSSON, L. **Lactic acid bacteria: classification and physiology**. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Ed.). **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 1-72.

BERNARDES, T. F. **Controle da deterioração aeróbia de silagens**. 2006. 103 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Júlio Mesquita, Jaboticabal.

BOLSEN, K. K. Silage: basic principles. In: BARNES, R. F.; MILLER, D. A.; NELSON, C. J. **Forages**. 5. ed. Ames: Iowa State University, 1995. p. 163-176.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Normas climatológicas (1961-1990)**. Brasília: MA/SNI/DNMET, 1992. 84 p.

CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M.; KUMAI, S. . Effect of Applying Lactic Acid Bacteria Isolated from Forage Crops on Fermentation Characteristics and Aerobic Deterioration of Silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 3, p. 520-526, Mar. 1999.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Recomendação para uso de corretivos e fertilizantes de Minas Gerais: 5 aproximação**. Viçosa, MG, 1999. 359 p.

DOMINGUES, F. P.; OLIVEIRA, M. D. S.; SIQUEIRA, G. R.; ROTH, A. P. T. P.; SANTOS, J.; ANDRADE, A. T.; MONTEIRO, R. R.; ROTH, M. T. P.; MAGARIO, F. B. Efeitos das doses de cal (cao) microprocessada e do tempo após o tratamento sobre a estabilidade aeróbia e dinâmica de microrganismos da cana-de-açúcar in natura. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. 1CD-ROM.

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**, Oxford, v. 4, n. 87, p. 583–594, Oct. 1999.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 330–343, Dec. 2001.

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Wahington, v. 69, n. 1, p. 562-567, Jan. 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 225-258.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 1080–1086, 2003.

GUIM, A.; ANDRADE, P.; ITURRINO-SCHOCKEN, R. P.; FRANCO, G. L.; RUGGIERI, A. C.; MALHEIROS, E. B. Estabilidade Aeróbica de Silagens de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) Emurcheado e Tratado com Inoculante Microbiano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2176-2185, nov./dez. 2002

JANK, L. Melhoramento e Seleção de variedades de *Panicum maximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 12., 1995, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p. 21-52.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D. Microbiologia de Forragens conservadas. In: VOLUMOSOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES, 1., 2003, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 1995. p. 1-26.

KUNG Jr., L. Aditivos microbianos e químicos para silagem: Efeitos na fermentação e resposta animal. In: WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM, 2., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 53-74.

LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. Review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 115-131, June 2003.

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

MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid-tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 454-460, 1983.

MUCK, R. Inoculant of silage and its effects on silage quality. In: INFORMATIONAL CONFERENCE WITH DAIRY AND FORAGE INDUSTRIES, 1996, **Proceedings...** US: Dairy forage Research, 1996. p. 43-52.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHAL, J. C. Silage fermentation processes and their manipulation. In: FAO ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE: Silage making in the tropics with emphasis on smallholders, 1999, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2000. p. 17-30.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J. A.; SPOELSTRA, S. F.; FABER, 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, Jan. 2001.

PEREIRA, L. G. R.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUES, J. A. S.; RODRIGUEZ, N. M.; BORGES, I.; TOMICH, T. R.; SALIBA, E. O. S.; GUIMARÃES JÚNIOR, R. Carboidratos solúveis, extrato etéreo e ácidos orgânicos das silagens de seis genótipos de girassol (*Helianthus annuus* L.) em diferentes períodos de fermentação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba-SP. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. 1CD-ROM.

- PEREIRA, O. G.; GOBBI, K. F.; PEREIRA, D. H.; RIBEIRO, K. G. Conservação de forragens como opção para o manejo de pastagens. IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa – PB, 2006. **Anais...** João Pessoa, 2006. 1CD-ROM.
- PLAYNE, M. J.; McDONALD, P. The buffering constituents of herbage. **Journal of Food Science and Agriculture**, Barking, v. 17, n. 6, p. 264-268, June 1966.
- RUIZ, R. L. **Microbiologia Zootecnica** São Paulo: Roca, 1992. 314 p.
- SAVIDAN, Y. H.; JANK, L.; COSTA, J. C. G. **Registro de 25 acessos selecionados de *Panicum maximum***. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1990. 68 p. (EMBRAPA/CNPGC. Documentos, 44).
- SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa/MG:UFV, 1990. 166 p.
- TAVARES, V. B. **Efeito da compactação na qualidade e estabilidade aeróbia da silagem de capim-tanzânia**. 2005. 76 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – UFLA, LAVRAS, MG.
- VALADARES FILHO, S. C. **Digestibilidade aparente e locais de digestão da matéria seca, energia e carboidratos de feno de soja perene**. Belo horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 1081. 88 p.
- WHITER, A. G.; KUNG, JR, L. The Effect of a Dry or Liquid Application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the Fermentation of Alfalfa Silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 10, p. 2195–2202, Oct. 2003.
- WINTERS, A. L.; WHITTAKER, P. A.; WILSON, R. K. **Grass and Forrage Science**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 191-196, June 1987.
- WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. 350 p.

## **CAPÍTULO 4**

### **PERFIL DE FERMENTAÇÃO E ESTABILIDADE AERÓBIA DAS SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADAS COM *L. buchneri***

## RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de duas cepas de *L. buchneri*, uma proveniente de um inoculante comercial e outra, isolada da silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), sobre o perfil de fermentação e a estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com três silagens (sem inoculante e com inoculantes experimental e comercial) e seis tempos de abertura dos silos (0, 3, 10, 30, 60 e 90 dias). Para avaliação da estabilidade aeróbia utilizou-se, também, um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, com parcelas subdivididas no tempo, em um esquema do tipo 3 x 4, ou seja, três silagens (silagens sem inoculantes e com inoculante experimental e comercial) e quatro tempos de avaliação aeróbica das silagens (0, 2, 4 e 6 dias após a abertura dos silos). Após um período de ensilagem de 90 dias, os silos foram abertos e destes foram retiradas amostras de cerca de 3,0 kg para avaliação da estabilidade aeróbica com base na temperatura e nas modificações químicas e microbiológicas ocorridas. A adição dos inoculantes influenciou nas modificações na composição química das silagens ao longo do processo, sendo que, onde houve interação entre os fatores, as silagens inoculadas apresentaram perfil semelhante, porém diferente da testemunha. Ao final do processo, a composição química de todas as silagens foi semelhante, com valores médios de 27,3; 3,7; 62,0; 38,6 e 23% de MS, PB, FDN, FDA e HEM, respectivamente. Houve intenso consumo dos carboidratos solúveis, resultando em pH de 3,5 em média. A população de fungos filamentosos esteve abaixo do nível detectável (2,0 log ufc/g) e a de BAL foi alta, mas a de leveduras foi intensamente inibida pelos inoculantes em função da mais alta concentração de ácido acético e propiônico, resultando, também, em menor produção de etanol nas silagens inoculadas. Após abertura, houve intenso crescimento de leveduras e a utilização dos produtos da fermentação causou aumento do pH. Com a exposição ao ar, a população de fungos filamentosos também aumentou. As modificações ocorreram em todas as silagens desde a abertura; porém, nas silagens inoculadas o aquecimento foi mais lento. A inoculação das silagens de cana com bactérias da espécie *L. buchneri* resultou em silagens com menor contagem de leveduras e maior estabilidade aeróbia, sendo os ácidos acético e propiônico os principais responsáveis por tal fato. Dos tratamentos avaliados no presente estudo, a silagem inoculada com inoculante experimental foi a que apresentou a maior estabilidade aeróbia, o que pode ser explicado pela maior concentração de ácido propiônico no momento da abertura dos silos, uma vez que o teor de ácido acético e a contagem de leveduras foram semelhantes aos da silagem com inoculante comercial.



## ABSTRACT

It was aimed by this work to evaluate the effect of the addition of two strains of *L. buchneri*, one coming from a commercial inoculant and the other isolated from sugar cane silage (*Saccharum* spp.) on the fermentation profile and aerobic stability of sugar cane silages. The experiment was conducted in a completely randomized design with three silages (without inoculant and with experimental and commercial inoculants) and six times of opening of the silos (0, 3, 10, 30, 60 and 90 days). For evaluation of the aerobic stability, a completely randomized design with three replicates with splitplots in time in a scheme of the 3 x 4 type, that is, three silages (silages without inoculant and with experimental and commercial inoculants) and four aerobic evaluation times of the silages (0, 2, 4 and 6 days after the silo- opening) were also utilized. After a 90-day period of ensiling, the silos were opened and from them were removed samples of about 3.0 kg for evaluation of the aerobic stability on the basis of temperature and chemical and microbiologic conditions occurred. The addition of inoculants influenced the modifications in the chemical composition of the silages throughout the process, where there was an interaction among the factors, the inoculated silages presented similar profile, but different from the control. At the end of the process, the chemical composition of all the silages was similar with average values of 27.3; 3.7; 62.0; 38.6 and 23.0% of DM, CP, NDF, ADF and HEM, respectively. There was a marked consumption of soluble carbohydrates resulting into pH of 3.5, on the average. The population of filamentous fungi was bellow the detectable level (2.0 log cfu/g) and that of LAB was high, but the one of yeasts was strongly inhibited by the inoculants as related with the highest concentration of acetic and propionic acids, resulting also into less production of ethanol in the inoculated silages. After the opening, there was a marked growth of yeasts and that utilizing the fermentation products caused increase of pH values. With the exposition to air, the population of filamentous fungi also increased. The modifications occurred in all the silages since opening, but in the inoculated silages heating was slower. The inoculation of the sugar cane silages with bacteria of the species *L. buchneri* resulted into silages with lower count of yeast and greater aerobic stability, acetic and propionic acids, being the main responsible for such a fact. Out of the treatments evaluated in the present study, the silage inoculated with the experimental inoculant was the one which presented the greatest aerobic stability, which can be explained by the highest concentration of propionic acid at the moment of the opening of the silos, since the content of acetic acid and count of yeasts were similar to those of the silage with commercial inoculant.

## 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar apresenta diversas características que a credenciam para o emprego na alimentação animal, tais como facilidade de cultivo e alta eficiência na conversão de energia solar em biomassa, resultando em grande produção de forragem por unidade de área (80 a 150 t/ha); baixo custo de produção por t de MS; manutenção do valor nutritivo por até 6 meses após a maturação, coincidindo a época de colheita ideal com o período de escassez de forragem (época seca do ano); abundância de açúcares solúveis de alta digestibilidade, podendo chegar a ter 50% de sacarose na MS; além de ser uma planta perene, possuindo um sistema radicular profundo, o que protege o solo contra erosão, e uma forrageira altamente energética (Corrêa, 2001; Lima & Mattos, 1993).

Apesar de todas essas características desejáveis, existem limitações na utilização da cana-de-açúcar exclusivamente na alimentação de ruminantes, principalmente em se tratando de animais de elevada exigência nutricional, como vacas leiteiras em lactação. O problema está no fato de que a cana-de-açúcar possui baixos teores de PB e alguns minerais como o P. Além disso, a cana possui baixa digestibilidade e utilização da energia digerida, apesar de apresentar digestibilidade intermediária. No entanto, quando essa deficiência é corrigida, conseguem-se resultados satisfatórios de consumo e ganho de peso (Boin & Tedeschi, 1993; Pedroso, 2003).

Na época da seca, a cana se encontra com alto valor nutritivo, podendo ser fornecida fresca e picada diariamente. Esta sempre foi a principal forma de utilização da cana-de-açúcar pelos pecuaristas brasileiros, principalmente para pequenos produtores. No entanto, esta forma de manejo apresenta algumas desvantagens, tais como demanda de mão-de-obra diária para cortes, despalhamento, picagem e transporte, estabelecendo, assim, uma limitação

operacional quando se pretende suplementar rebanhos de maior porte; dificuldade de corte em períodos chuvosos; impossibilidade de utilizar cana de qualidade o ano todo, pois ocorre queda no teor de sacarose; e dificuldade no manejo do canavial, pois existem plantas de diferentes idades e com qualidade nutricional diferente (Nussio et al., 2003).

Diante disso, a utilização da cana-de-açúcar sob a forma de silagem passou a ser uma alternativa muito discutida nos últimos anos. A ensilagem possibilita a colheita de grandes áreas em curto espaço de tempo na época seca, quando a forrageira apresenta melhor valor nutritivo, e que coincide com um período mais propício aos trabalhos no campo (Pedroso, 2003). Além de resolver problemas com mão-de-obra e manejo, a ensilagem também apresenta-se como solução para certos problemas, como em canaviais destinados à indústria, os quais devem ser manejados de forma a evitar os excedentes de produção, o que exigiria a manutenção da biomassa até a nova safra, com a formação de canas bisadas (Nussio et al., 2003).

Outros fatores, como flutuações nos preços do açúcar e do álcool, podem exigir redução da oferta de cana para as indústrias, devendo-se dar um destino alternativo à cana-de-açúcar existente. Canaviais submetidos a incêndio voluntário ou acidental, ou queimados pela geada, precisam ser usados rapidamente para evitar a conversão da sacarose e a respiração indesejável de carboidratos, gerando a necessidade da decisão pelo processo de ensilagem (Nussio et al., 2003).

Teoricamente, a cana-de-açúcar poderia ser ensilada sem qualquer problema, pois contém as principais características necessárias para o processo de produção de silagem, que são de MS em torno de 25 e 30%; alto teor de carboidratos solúveis e poder tampão que permite a queda rápida do pH para valores próximos a 3,5. Todavia, a silagem de cana-de-açúcar apresenta intensa fermentação alcoólica por leveduras, o que conduz a altas taxas de perda de MS.

Além disso, as silagens apresentam alto teor de carboidratos residuais e ácidos láctico e acético. Estes compostos são substratos potencialmente utilizáveis pelos microrganismos deterioradores da silagem após a abertura dos silos.

Em silagem, tanto a atividade aeróbia quanto a aneróbia de leveduras são consideradas indesejáveis. Sob condições anaeróbias, as leveduras fermentam açúcares a etanol e CO<sub>2</sub>. Esse etanol produzido não somente diminui a quantidade de açúcar disponível para as BAL, mas também tem um efeito negativo sobre o sabor do leite. Sob condições aeróbias, muitas espécies de levedura degradam o ácido láctico, causando um aumento do pH da silagem, proporcionando, assim, condições para que outros microrganismos deterioradores se desenvolvam (McDonald et al., 1991).

O etanol produzido, apesar de potencialmente aproveitável como substrato energético para bovinos através da conversão a ácido acético no rúmen, tem grande parte perdida durante a estocagem. A produção desse álcool acarreta perdas de aproximadamente 49% da MS dos substratos (McDonald, 1991).

Vários trabalhos foram conduzidos avaliando a adição de bactérias heteroláticas da espécie *L. buchneri* sobre silagens de gramíneas (Driehuis et al., 1999; Nishino et al., 2002; Ranjit et al., 2002). Em geral, nesses trabalhos observou-se um maior teor de ácido acético, associado a uma redução do crescimento de leveduras, aumentando a estabilidade aeróbia das silagens. Diante desses resultados, nos últimos cinco anos pesquisadores brasileiros têm desenvolvido trabalhos para avaliar o efeito da inoculação dessa espécie bacteriana às silagens de cana-de-açúcar..

A adição de *L. buchneri* à silagem de cana de açúcar poderá ser benéfica de duas formas: inibindo o crescimento de leveduras, fazendo com que a produção de etanol seja menor, e pelo aumento da estabilidade aeróbia das silagens.

Existem divergências entre os resultados sobre a inoculação daquela bactéria às silagens de cana-de-açúcar. Durante o processo fermentativo, Pedroso et al. (2005) observaram reduções nas perdas gasosas (9,7 para 8,4% da MS) e melhoria significativa na recuperação de MS (80,9 para 90,5%) nas silagens de cana aditivada em relação à silagem controle, respectivamente. De modo semelhante, o trabalho com silagens de cana-de-açúcar conduzido por Siqueira (2005) possibilitou maiores recuperações de MS da silagem de cana-de-açúcar aditivada com *L. buchneri* em relação à silagem controle (80,8 vs 67,5%). Entretanto, Sousa (2006) concluiu que a inoculação não foi eficiente na redução da produção de gases e perdas de MS em relação às silagens sem aditivos.

Com relação à melhoria da estabilidade aeróbia, estudos têm mostrado que adição de bactérias heteroláticas da espécie *L. buchneri* em silagens de gramíneas (Driehuis et al., 1999; Nishino et al., 2002, Ranjit & Kung Jr., 2002) em geral resulta em maior teor de ácido acético, inibindo o crescimento de leveduras e aumentando a estabilidade aeróbia das silagens. Além disso, essas bactérias têm habilidade para metabolizar ácido láctico a ácido acético, reduzindo a concentração de substrato potencialmente utilizável por leveduras e aumentando o efeito inibitório pelo aumento da concentração de ácido acético.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição de duas cepas de *L. buchneri*, uma proveniente de um inoculante comercial e outra isolada da própria silagem de cana, sobre o perfil de fermentação e a estabilidade aeróbia dessa forrageira.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local e Período**

O experimento foi conduzido nos Departamentos de Zootecnia e Biologia da Universidade Federal de Lavras – MG.

A Estação Climatológica Municipal de Lavras, MG, está situada no Campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, Estado de Minas Gerais, em convênio com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMER), encontrando-se em latitude de 21°14' S, longitude de 45°00' W e altitude de 918,84 m (Brasil, 1992). Segundo a classificação internacional de Köppen, o clima da região é do tipo Cwa, subtropical com verão quente e chuvoso e inverno frio e seco, caracterizado por um total de 23,4 mm de chuvas no mês mais seco e 295,8 mm no mês mais chuvoso, precipitação total anual de 1.529,7 mm e temperaturas médias máxima mensal igual a 22,1 em fevereiro e mínima mensal igual a 15,8°C em julho.

### **2.2 Delineamento Experimental e Tratamentos**

O experimento para avaliação do perfil de fermentação das silagens de cana-de-açúcar foi conduzido obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, e os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3 x 5, sendo três silagens (sem inoculante, com inoculantes experimental e com inoculante comercial) e cinco tempos de abertura dos silos (0, 3, 10, 30, 60 e 90 dias de fermentação). Os dados foram analisados estatisticamente pelos procedimentos de análise de variância para os experimentos fatoriais. Aqueles de natureza qualitativa foram comparados por meio do teste Scott-Knott e os de

natureza quantitativa foram submetidos ao estudo de regressão. O modelo linear estatístico utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

$Y_{ijk}$  é o valor observado na  $k$ -ésima repetição do  $j$ -ésimo tempo e do  $i$ -ésimo inoculante;

$\mu$  é uma constante inerente a todas as observações;

$a_i$  é o efeito do  $i$ -ésimo inoculante ( $i = 1,2,3$ );

$b_j$  é o efeito do  $j$ -ésimo tempo de abertura ( $j = 1,2,3,4,5,6$ );

$ab_{ij}$  é o efeito da interação entre o  $i$ -ésimo inoculante com o  $j$ -ésimo tempo de abertura;

$e_{ijk}$  é o erro associado à observação  $Y_{ijk}$ , considerado independente com média igual a zero e variância constante.

O experimento para avaliação da estabilidade aeróbia das silagens também foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo os fatores dispostos em esquema de parcelas subdivididas no tempo, com as silagens (sem inoculantes, com inoculante experimental e com inoculantes comercial) dispostas nas parcelas e os tempos de avaliação 0, 2, 4 e 6 dias após abertura dos silos nas subparcelas. O modelo linear utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + e_{j(i)} + d_k + e_{jk} + ad_{ik} + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

$Y_{ijk}$  é o valor observado na  $k$ -ésima repetição do  $j$ -ésimo tempo e do  $i$ -ésimo inoculante;

$\mu$  é uma constante inerente a todas as observações;

$a_i$  é o efeito do  $i$ -ésimo inoculante (tratamento da parcela);

$e_{j(i)}$  é o erro experimental associado à parcela;

$d_k$  é o efeito do  $k$ -ésimo dia de avaliação (tratamento da subparcela);

$e_{j(k)}$  = erro associado aos tratamentos da subparcela (dias);

$ad_{ik}$  é o efeito da interação entre o  $i$ -ésimo inoculante com o  $k$ -ésimo dia de avaliação;

$e_{ijk}$  é o erro associado à observação  $Y_{ijk}$ , considerado independente, com média igual a zero e variância constante.

### **2.3 Preparo da forragem para ensilagem**

A cana utilizada foi colhida com facão, em um canavial estabelecido no Departamento de Zootecnia, e picada em máquina estacionária, proporcionando partículas de 10 a 30 mm para a produção da silagem.

### **2.4 Preparo dos inoculantes**

Os inoculantes foram previamente preparados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFLA. O inoculante experimental consistiu da bactéria *Lactobacillus buchneri* isolada de uma silagem de cana-de-açúcar, como especificado no Capítulo 2. Já o inoculante comercial empregado foi o inoculante Pioneer 11A44TM (Pioneer Hi-Bred International, Inc., Des Moines, IA, USA), que contém a bactéria *L. buchneri* na concentração  $10^{11}$  ufc/g do produto.

O inoculante comercial foi adicionado de acordo com a recomendação do fabricante de 8 log ufc/kg ou 5 log ufc/g de forragem. Para tanto, foi pesado 0,003g do inoculante, o qual foi misturado a 80 ml de água destilada estéril e, posteriormente, borrifado sobre a forragem no momento da ensilagem.

Para que ambos fossem adicionados com a mesma concentração de células viáveis, foi feita a contagem do número destas no inoculante experimental através de plaqueamento em meio MRS (Tabela 15A).



Inicialmente, o microrganismo foi cultivado em tubos contendo 2 ml de caldo MRS por 24 horas; depois foi transferido para tubos contendo 10 ml de caldo MRS por mais 24 horas e, finalmente, transferido para erlenmeyer com 250 ml de caldo MRS e cultivado por 24 horas. Após este tempo, foi feita a contagem do número de células, obtendo-se um resultado de 9 log ufc/ml do caldo. Para cada silo foi retirado, então, 0,3 ml do caldo presente no erlenmeyer, que foi posteriormente misturado com 80 ml de água destilada estéril e borrifado sobre 3kg de forragem para ser ensilada. Ao final, o inoculante experimental foi inoculado em uma concentração de 8 log ugc/kg de forragem, que corresponde a 5 log ufc/g de forragem.

## **2.5 Preparo das silagens e formação dos tratamentos**

A forragem picada foi ensilada em silos de PVC com diâmetro de 10 cm e altura de 80 cm, adaptados com válvula tipo Bunsen, com capacidade para aproximadamente 2,5 a 3 kg de forragem, sendo utilizada uma densidade de compactação de aproximadamente 600 kg de forragem por m<sup>3</sup>.

Os inoculantes preparados anteriormente foram misturados à forragem no momento da ensilagem, com auxílio de um borrifador (sendo um para cada tratamento). Teve-se o cuidado de adicionar à testemunha somente água destilada estéril, na mesma quantidade de água que foi adicionada junto com os inoculantes (80 ml).

A forragem foi compactada manualmente nos silos, com barra de ferro, os quais foram armazenados com a válvula voltada para baixo (para que o efluente produzido fosse eliminado), em temperatura ambiente e sob a proteção da luz solar e chuvas. Foram retiradas amostras da forragem fresca, sem e com inoculantes, das quais uma parte foi encaminhada para o freezer e outra, para a estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas, moída e armazenada para

análises posteriores. Uma terceira amostra foi colhida para contagem da população de microrganismos e leitura do pH. A forragem foi compactada manualmente nos silos, com barra de ferro, os quais foram armazenados com a válvula voltada para baixo (para que o efluente produzido fosse eliminado), em temperatura ambiente e sob a proteção da luz solar e chuvas.

## **2.6 Avaliação do perfil de fermentação das silagens**

Para a avaliação do perfil de fermentação das silagens, os silos foram abertos com 0, 3, 10, 30, 60 e 90 dias de fermentação e de cada silo foram retiradas duas amostras, tomando-se o cuidado de desprezar as silagens das extremidades dos silos. Destas amostras, uma foi pesada e seca em estufa de ventilação forçada a 65°C e a outra foi colocada em sacos plásticos devidamente identificados e congelados. No momento da abertura de cada silo foi retirada uma terceira amostra para determinação do pH e contagem da população de microrganismos.

As análises bromatológicas da forragem fresca e das silagens foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Animal do DZO-UFLA. As amostras secas foram moídas em moinho do tipo Willey, com peneira de 30 mesh, e armazenadas em potes plásticos devidamente identificados e encaminhados ao laboratório para a determinação dos teores de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB), conforme os métodos recomendados pela AOAC (1990); fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo as técnicas descritas por Silva (1990); e teor de hemicelulose pela diferença entre FDN e FDA.

O teor de carboidratos solúveis (CHOs) também foi determinado com amostra seca, conforme a técnica de Bailey (1977) modificada por Valadares Filho (1981). O princípio do método consiste na extração dos carboidratos com

solução alcoólica a 80%, reação com solução ácida preparada com antrona e posterior leitura em Espectrofotômetro, utilizando solução de glicose para o preparo da curva padrão.

Das amostras congeladas extraiu-se o suco, com prensa hidráulica, para a determinação do teor de nitrogênio amoniacal como porcentagem do nitrogênio total [ $\text{N-NH}_3$ (% N total)], ácidos graxos voláteis, ácido láctico e etanol por cromatografia gasosa (AOAC, 1980). Para análise cromatográfica foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu GC17a; Coluna capilar (30m x 0,025mm), com temperatura inicial de 90°C e final de 180°C, pressão de 22 e fluxo de 20 (AOAC, 1980).

O poder tampão foi determinado somente para a forragem não ensilada (tempo 0), utilizando amostras congeladas de acordo com a técnica descrita por Playne & McDonald (1966). Para tanto, foram pesadas 15 g de amostra do material fresco, as quais foram maceradas em liquidificador com 250 ml de água destilada. O macerado foi titulado primeiramente para pH 3,0, com HCl 0,1N, para liberar bicarbonatos e  $\text{CO}^2$  e, em seguida, titulado para pH 6,0 com NaOH 0,1N. A capacidade tampão é expressa como equivalente miligrama (e.mg) de ácidos requeridos para mudar o pH de 4,0 para 6,0 por 100 g de MS, após correção para o valor da titulação de 250 ml de água. Com base nos teores de carboidratos solúveis, MS e do poder tampão, foi calculado o coeficiente de fermentação (CF) do capim-mombaça e da cana-de-açúcar segundo Weissback & Honig (1996), citados por Oude Elferink, 2000.

Da terceira amostra coletada foi retirada uma subamostra de 80 g, a qual, a seguir, foi misturada com água peptonada estéril e encaminhada imediatamente ao Laboratório de Microbiologia para a avaliação da população de fungos filamentosos, leveduras e bactérias do ácido láctico (BAL). Foi coletada, também, uma subamostra de 10 g de silagem para se proceder à leitura do pH por meio de um potenciômetro Beckman Expandomatic SS-2.

As análises microbiológicas da forragem e das silagens foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da UFLA. Foram efetuadas as contagens de BAL, leveduras e fungos filamentosos em todos os tempos de abertura dos silos. Foi coletada uma subamostra de 80 g de silagem de cada silo, a qual foi colocada, assepticamente, em frascos contendo 720ml de água peptonada estéril (1% de peptona), esterilizada a 121°C/15 min.) e agitada durante 20 minutos. A partir do extrato obtido, foram preparadas diluições decimais de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .

As contagens totais de BAL, leveduras e fungos filamentosos foram realizadas tomando-se 0,1 ml de cada diluição, em triplicata, o qual foi espalhado com alça de Drigalsky no meio MRS (Tabela 15 A); acrescido de nistatina (0,4%) para contagem de bactérias ácido lácticas; no meio DRBC (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol) (Tabela 15A) para a contagem de fungos filamentosos; e meio YEPG (Tabela 15A) para a contagem de leveduras. As placas foram incubadas a 28°C e a contagem total de bactérias foi realizada após 24-72 horas de incubação. Para a contagem de fungos filamentosos e leveduras, as placas foram incubadas por 24 a 72 horas.

Os dados foram analisados estatisticamente pelos procedimentos de análise de variância para os experimentos fatoriais, utilizando o programa SISVAR (Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados) (Ferreira, 2000), de acordo com o esquema de variância mostrados nas tabelas em anexo (Tabelas 1A a 14A). Quando os tratamentos foram significativos, foi feita comparação múltipla, utilizando o teste de Scott-Knott (no caso de comparação entre as silagens) ou regressão, quando os tratamentos eram de natureza quantitativa, como no caso dos tempos de abertura dos silos. Para os tempos de abertura dos silos, em decorrência do tipo de comportamento utilizou-se modelos mais complexos, com graus superiores a três, visto que, em alguns casos, modelos mais simples não foram hábeis em representar as modificações temporais ocorridas ao longo do processo de fermentação.

## **2.7 Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens**

O experimento para avaliação da estabilidade aeróbia foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, com os tratamentos dispostos em esquema de parcelas subdivididas no tempo, sendo os dias de avaliação considerados como subparcela no tempo, com as três silagens (silagens sem inoculantes e com inoculante experimental e comercial) nas parcelas e quatro tempos de avaliação aeróbica das silagens (0, 2, 4 e 6 dias após a abertura dos silos), considerados como tratamentos da subparcela no tempo.

Após um período de ensilagem de 90 dias, os silos foram abertos e de cada silo foi retirada uma amostra de cerca de 3,0 kg, que foi acondicionada em baldes plásticos de aproximadamente 5,0 kg cada para avaliação da estabilidade aeróbia. Essas amostras ficaram em uma sala fechada, em que foi monitorada a temperatura de cada amostra diariamente. Para isto, um termômetro foi inserido na massa ensilada, numa profundidade de 10 cm, durante 10 dias. A temperatura da massa ensilada foi tomada duas vezes ao dia, às 8:00 e às 17:00 horas, e a temperatura ambiente foi medida com o auxílio de um termômetro localizado próximo aos baldes. A estabilidade aeróbia foi calculada como sendo o tempo em horas observado para que o alimento volumoso, após a abertura do silo, apresentasse elevação da temperatura em 2°C em relação à temperatura ambiente (Kung Jr. et al.,2000), que apresentou média de 23,3°C e variação entre 22 e 25°C. Também foi efetuado um estudo de regressão das temperaturas das silagens durante o período de cinco dias.

Durante esse período, nos dias 0, 2, 4 e 6 foram retiradas amostras para a realização das análises laboratoriais. Destas amostras, uma parte foi colocada em sacos plásticos devidamente identificados e congelados para as determinações das concentrações de AGV, ácido lático, etanol e nitrogênio amoniacal. A outra parte foi colocada em água peptonada estéril e encaminhada, imediatamente, ao

Laboratório de Microbiologia para as avaliação das populações de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. No momento da abertura de cada silo foi retirada uma amostra de 10 g de silagem para se proceder à leitura do pH, por meio de um potenciômetro Beckman Expandomatic SS-2. Uma teceira amostra coletada foi pesada, seca em estufa de ventilação forçada a 65°C, posteriormente moída em moinho do tipo Willey, com peneira de 30 mesh, armazenada em potes plásticos devidamente identificados e encaminhada ao laboratório para a determinação dos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e carboidratos solúveis (CHOs). Todas as análises químicas, bromatológicas e microbiológicas realizadas durante a avaliação da estabilidade aeróbia foram feitas utilizando as mesmas técnicas utilizadas durante a avaliação do perfil de fermentação citadas no item anterior.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Composição química da forragem de cana-de-açúcar antes da ensilagem

As composições químicas da cana fresca pura e com os inoculantes experimental e comercial estão mostradas nas Tabelas 1.

**TABELA 1** – Valores médios da composição química, pH, poder tampão (PT) e coeficiente fermentativo (CF) da cana-de-açúcar antes da ensilagem sem inoculante (1) e com inoculantes experimental (2) e comercial (3).

Inoculantes	MS	PB	FDN (%)	FDA	HEM	CHO (g/Kg)	PT E.mg NaOH/100 g MS	CF	pH
1	29,3a	3,4a	57,8a	31,8a	25,9a	300,6a	11,0	248	5,6a
2	29,9a	3,2a	56,8a	31,9a	24,8a	283,2b	10,6	242	5,6a
3	29,5a	2,9a	56,2a	31,5a	24,7a	299,1a	10,4	260	5,6a

<sup>11</sup> Teores de matéria seca (MS); proteína bruta (PB); fibra em detergente neutro (FDN); fibra em detergente ácido (FDA); hemicelulose (HEM); carboidratos solúveis (CHOs); potencial hidrogeniônico (pH); poder tampão (PT) e coeficiente fermentativo (CF). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferenciam entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

A composição química da cana, antes da ensilagem, com exceção dos teores de carboidratos solúveis (CHOs), não sofreu influência da inoculação com *L. buchneri* na concentração de  $10^8$  células/g. Desse modo, os dados serão discutidos com os valores médios dos tratamentos. Para os teores de CHOs, a forragem com inoculante experimental mostrou menor concentração, porém este resultado provavelmente ocorreu em função de erros de análises laboratoriais.

Os valores aqui relatados estão próximos, com pequenas variações, dos encontrados na literatura. Os teores de MS (29,3%) e PB (3,2%) foram superiores aos encontrados na literatura, como 27,4% e 2,0% (Coan et al., 2005); 28,3% e 2,3% (Molina et al., 2002) e 28,6% e 2,6% (Freitas et al., 2006). Os teores de FDN (57,0%) e FDA (31,8%) também foram superiores aos encontrados por outros autores, variando de 36,2 a 49% para FDN e de 23,6 a

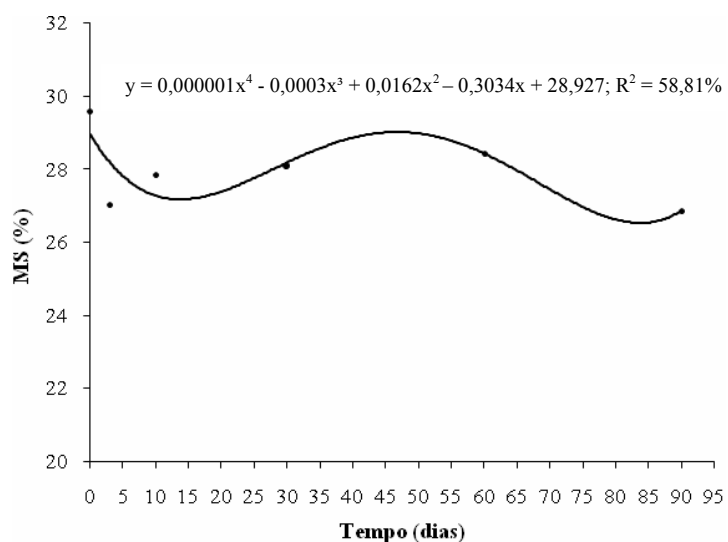
32% para FDA (Fernandes et al., 2003; Pedroso et al., 2005; Freitas et al., 2006). As concentrações de carboidratos solúveis estão dentro da faixa encontrada por alguns autores ( 20 a 40%), porém foram inferiores às encontradas por Freitas et al. (2006) e superiores às encontradas por Pedroso et al. (2003). Estas diferenças podem estar relacionadas à forragem e, também, às diferentes técnicas de análise.

A capacidade fermentativa (CF) é calculada com base nos teores de MS, carboidratos solúveis e poder tampão. Para a cana-de-açúcar foi encontrado valor muito alto, quando comparado com a maioria das forrageiras, ao redor de 250. Pelas recomendações de Weissbach & Honnig (1996) citados por Olde Elferink (2000), forragens com CF superior a 35 são consideradas adequadas para a ensilagem. No caso da cana, esse excesso de carboidratos solúveis, associado à alta população de leveduras epífitas (em torno de 6,0 log da ufc/g de forragem) e ao teor de MS (28%) em que a cana foi ensilada, ainda aliado ao fato de que a ensilagem resulta em alto teor de carboidratos solúveis residuais, além de prejudicar o processo de fermentação alcoólica por leveduras, conduz a altas perdas de MS e reduz a estabilidade aeróbia das silagens. Portanto, este não é um índice confiável para essa cultura, uma vez que ele foi desenvolvido para gramíneas de clima temperado.

### **3.2 Variações na composição química das silagens de cana-de-açúcar com a fermentação**

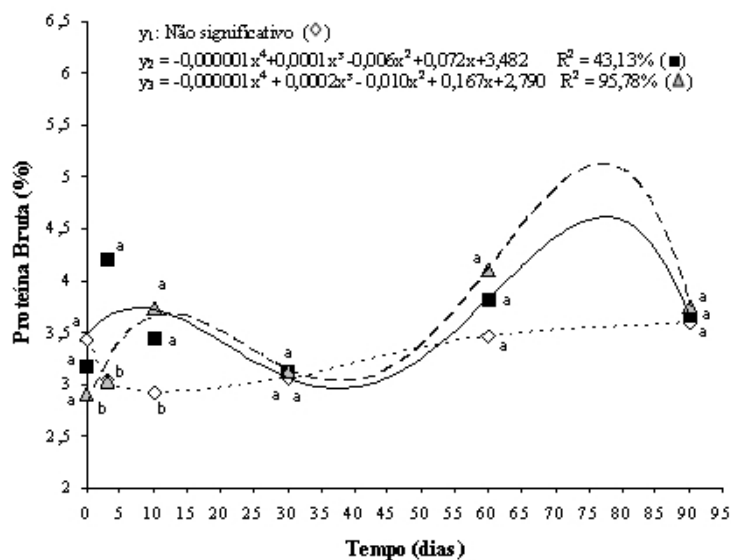
O teor de MS das silagens de cana-de-açúcar variaram significativamente ( $P < 0,01$ ) apenas pelos tempos de abertura dos silos (Tabela 8A). A variação foi pequena, em torno de 2 unidades percentuais. Ao final do processo, as silagens apresentaram teores médios de MS menores que da forragem original (Figura 1).





**FIGURA 1.** Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação dos teores de matéria seca das silagens de cana-de-açúcar (valores médios dos tratamentos) em função dos tempos de abertura dos silos.

Com relação aos teores de PB das silagens, houve interação significativa ( $P < 0,01$ ) entre inoculantes e tempos de abertura dos silos. O teor de Pb da silagem controle não variou com o período de fermentação, registrando valores médios de 3,4. Para as silagens inoculadas, foram observadas maiores variações nos teores protéicos; no entanto, ao final do processo, as silagens submetidas aos três tratamentos apresentaram o mesmo teor de PB, mas levemente superiores à cana fresca (Figura 2).



**FIGURA 2 .** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação dos teores de PB das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.

Com relação aos componentes da parede celular, houve efeito da interação inoculante x tempo de abertura dos silos para as variáveis FDA e HEM (Tabela 8A e 9A). Já o FDN foi afetado por inoculante e tempo de abertura dos silos. Observa-se, na Tabela 3, que as silagens não inoculadas mostraram menores valores de FDN do que as inoculadas, as quais não diferiram estatisticamente entre si ( $P > 0,05$ ). Na Figura 3 encontra-se a variação de FDN em função do tempo de abertura dos silos. Os três tratamentos mostraram comportamento semelhante, com variações mais intensas no início do processo, com pequeno aumento até aproximadamente 15 dias, seguido de redução a valores próximos ao valor obtido na silagem aos 90 dias (56,2%). O teores

médios de FDN das silagens ao final do processo de fermentação (90 dias) foram mais altos que os da forragem original (Figura 3).

**TABELA 2** – Valores de FDN (%) das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante e com inoculantes experimental e comercial

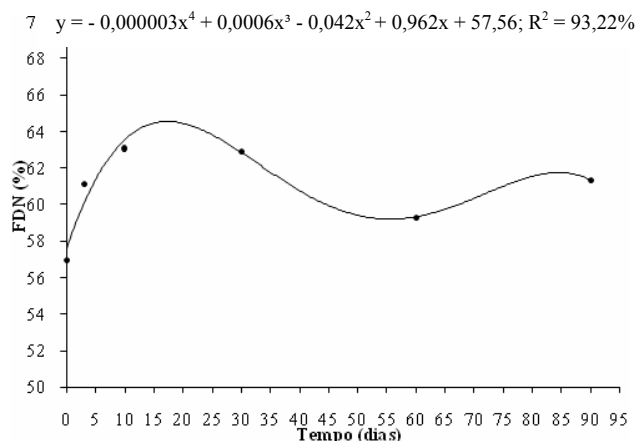
Silagens	Médias
Sem inoculante	59,62 b
Experimental	61,62 a
Comercial	61,10 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

Com o decorrer do processo de fermentação, as silagens sem inoculante mostraram maiores variações nos teores de FDA do que as inoculadas com inoculantes experimental e comercial, que apresentaram comportamento quadrático. Comparando a forragem original com a silagem resultante, nota-se aumento nos teores de FDA com a fermentação, os quais, por sua vez, não diferiram ao final do processo (Figura 4 e Tabela 2).

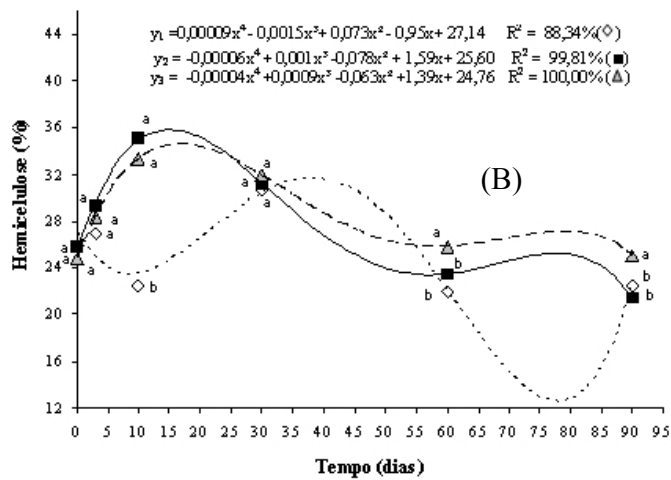
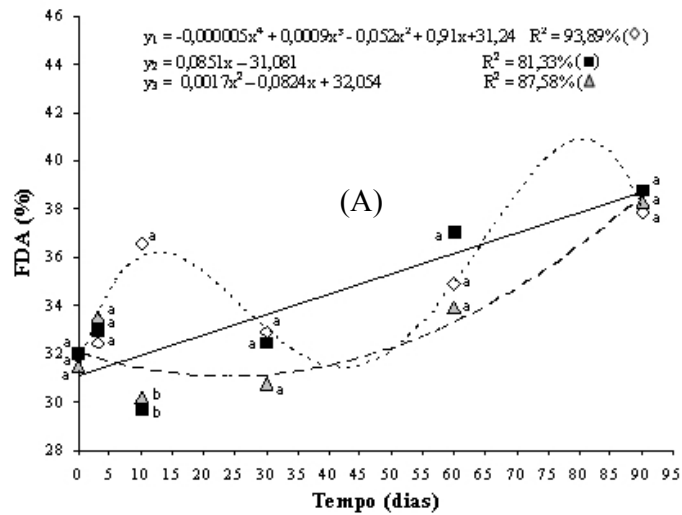
Foram observadas variações nos teores de HEM de todas as silagens ao longo do processo. Os comportamentos das silagens inoculadas, apesar de diferentes, mostraram tendência semelhante, com aumento nos primeiros 10 dias de fermentação; em seguida, os valores tenderam a diminuir até o final do processo (Figura 4). Os teores de HEM da silagem sem inoculante também sofreram variações ao longo do processo e estas foram muito diferentes das silagens inoculadas, com aumento de aproximadamente 40 dias, redução até aos 80 dias e novo aumento aos 90 dias (Figura 4).

No momento de abertura dos silos, com exceção dos teores de HEM, os teores de MS, PB, FDN e FDA foram semelhantes para as três silagens, mostrando que a adição de *L. buchneri* à cana-de-açúcar não causou efeitos significativos na composição química das silagens com 90 dias de fermentação.



**FIGURA 3.** Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação dos teores de FDN das silagens de cana-de-açúcar em função dos tempos de abertura dos silos.

Comparando a composição química da cana fresca (Tabela 1) com a da silagem correspondente, notaram-se menores teores de MS e maiores teores de FDN, FDA e PB com a fermentação. Este comportamento é comum em silagens de cana-de-açúcar e também foi verificado em outros trabalhos. Freitas et al. (2006) constataram redução de 8% e aumento de 28, 20 e 0,8% nos teores de MS, FDN, FDA e PB, respectivamente, em silagens de cana-de-açúcar com 45 dias de fermentação. Comportamento semelhante foi verificado por Pedroso et al. (2005), relatando redução de 8,4% nos teores de MS e elevação de 21; 12,6 e 0,8% nos teores de FDN, FDA e PB, respectivamente, para silagens de cana sem aditivos aos 90 dias de fermentação. Já no trabalho de Lopes (2005), a redução do teor de MS foi de 7% e os aumentos respectivos dos constituintes FDN, FDA e PB foram de 12,97; 8,81 e 0,8% para silagem de cana pura com 180 dias de fermentação. Por sua vez, Sousa (2006) verificou redução de 31 para 22% nos teores de MS e aumentos de 48,7 para 68% nos teores de FDN e de 2,8 para 3,5% nos teores de PB em silagens de cana pura com 110 dias de fermentação.



**FIGURAS 4.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação dos teores de FDA (A) e hemicelulose (B) das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.

Em um estudo de fermentação de silagens de cana-de-açúcar com diferentes inoculantes, Sousa (2006) constatou aumentos de 47 para 67% e de 2,4 para 3,6% nos teores de FDN e de PB nas silagens controle e inoculada com *L. buchneri*, não havendo diferença no padrão de fermentação ao longo do processo (interação não significativa) para essas variáveis. Para os teores de MS, o autor verificou modificações somente após 7 dias de fermentação, sendo que, para as silagens inoculadas com *L. buchneri* (5 log ufc/g), as variações foram mais intensas entre 7 e 15 dias, e para as silagens controle nas três datas finais de abertura, 15, 35 e 110 dias. Como pode ser observado nos trabalhos citados, é comum a ocorrência de aumento da fração fibrosa e redução dos teores de MS das silagens de cana em relação ao material original. O aumento da fração fibrosa do material ensilado pode ocorrer devido à intensa formação de efluentes durante o processo fermentativo, no qual os componentes solúveis em água são reduzidos proporcionalmente ao aumento da fração menos fermentável insolúvel em água, particularmente os constituintes da parede celular (Van Soest, 1994). Pode, também, ocorrer por causa da perda de carboidratos solúveis, na forma de gases, ou por meio da formação da chamada “água de metabolismo”, formada durante a síntese de etanol ou metabolismo de fermentação de açúcares por bactérias, o que também é responsável pela diminuição no teor de MS.

Nos trabalhos realizados com cana estas modificações têm sido associadas mais com perda de MS, na forma de gases, devido à fermentação alcoólica por leveduras, do que a perdas por efluentes. Nos trabalhos de Freitas et al. (2006) e Pedroso et al. (2003) não houve produção de efluente. Esses autores concluíram que essas modificações nos teores de MS, FDN e FDA decorreram das perdas de carboidratos solúveis na forma de gases e da produção da água de metabolismo.

O aumento na concentração de PB observado durante a ensilagem pode, também, ser explicado pela redução nos teores de MS, o que,

proporcionalmente, faz com que haja aumento no teor protéico. Neste trabalho, a variação foi de apenas 0,8%, que está dentro da faixa de variação de 1 a 2% citada por Rotz & Muck (1994), em razão do mesmo processo citado anteriormente.

Com relação às modificações temporais ocorridas na composição química da cana-de-açúcar, houve influência significativa ( $P < 0,01$ ) dos inoculantes para os teores de FDA, HEM e PB. Nestes, em geral, as silagens com inoculantes comercial e experimental mostraram perfil parecido mas diferente da testemunha.

As equações que se ajustaram às modificações dessas variáveis foram, na maioria dos casos, polinômios de quarto grau. Assim, não foi possível estabelecer uma seqüência lógica das modificações dessas variáveis ao longo do processo. Este comportamento se deve ao fato de que, durante a fermentação, vários fatores estão envolvidos, influenciando o comportamento dessas variáveis, como já mencionado anteriormente, e fazendo com que haja aumento ou diminuição de alguns deles em determinado momento do processo. O importante, neste estudo, foi avaliar o comportamento geral das silagens em função dos diferentes tratamentos e a composição química das silagens resultantes.

A análise estatística detectou interação significativa ( $P < 0,01$ ) (Tabela 9A) entre os fatores inoculante e tempo de abertura dos silos para as concentrações de CHOs das silagens. Cada uma das três silagens mostrou comportamento diferente, porém seguindo a mesma tendência. Para as três silagens, a equação que melhor se ajustou às modificações ocorridas ao longo da fermentação foi um polinômio de quarto grau. Foi observada grande redução nos primeiros 20 dias de fermentação e, a partir daí, variações menores até aos 90 dias (Figura 5).

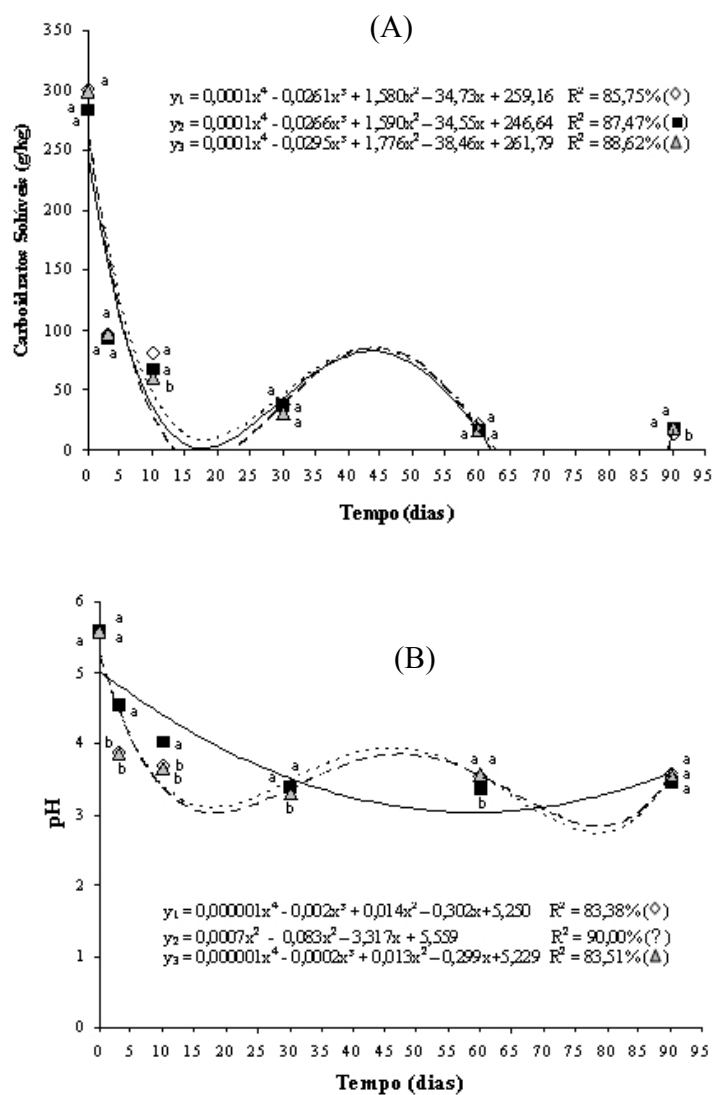
Ao final do processo de fermentação, as silagens sem inoculantes apresentaram menor concentração de CHOs residuais (12,7 g/kg) do que as inoculadas, entre as quais não houve diferença estatística (18,45 g/kg). Estes resultados estão de acordo com os relatados por Queiroz (2006), que mostrou haver preservação de CHOs em silagens de cana adicionadas de *L. buchneri*, quando comparadas ao tratamento controle, 36,6 e 17,9 g/kg, respectivamente.

Freitas et al. (2006) também observaram intensa redução nos teores de CHOs durante os primeiros 15 dias; porém, ao contrário do observado no presente trabalho, os autores encontraram maiores concentrações de CHOs residuais nas silagens controle em relação à inoculada com *L. buchneri*, sendo iguais a 64 e 48 g/Kg para silagens de cana pura e inoculada com *L. buchneri*, respectivamente, aos 45 dias de fermentação.

Concentrações de CHOs residuais mais altas indicam menores perdas de MS durante a fermentação, constituindo vantagem. No entanto, quando essas silagens são expostas ao ar, em geral tendem a deteriorar mais rápido, a não ser que exista algum fator que aumente a sua estabilidade, o que constitui uma desvantagem.

O pH foi influenciado pela interação entre inoculante x tempos de abertura dos silos (Tabela 9A). A queda do pH ocorreu de forma mais rápida para as silagens testemunha e inoculada com inoculante comercial, alcançando valor mais baixo aproximadamente aos 15 dias (Figura 5). Já na silagem inoculada com inoculante experimental, a queda foi mais lenta, alcançando menor valor com aproximadamente 30 dias. Apesar da queda mais lenta, com cerca de 20 dias todas as silagens já apresentavam valores de pH abaixo de 4,0, o que já é um valor indicativo de boa fermentação, no qual a maioria dos microrganismos que são intolerantes ao pH ácido são inibidos. Não foi detectada a presença de ácido butírico, o que leva a concluir que não houve crescimento de bactérias do gênero *Clostridium*.





**FIGURA 5.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação dos teores de carboidratos solúveis (A) e valores de pH (B) das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.

O pH é um dos fatores de maior importância na inibição de microrganismos indesejáveis. As enterobactérias são prejudiciais, principalmente na fase inicial de fermentação. O pH ótimo para seu crescimento é de 6,0 a 7,0; assim, a maioria das cepas de *Enterobacteriaceae* não cresce em pH abaixo de 5,0 (Bolsen, 1995). As bactérias do gênero *Listeria* spp. podem tolerar valores de pH de 3,8-4,2 por longos períodos se o oxigênio está presente mesmo que em baixos níveis; no entanto, sob condições estritamente anaeróbicas aqueles microrganismos são rapidamente mortos se os valores de pH são baixos (Oude Elferink et al., 2000). Os clostrídeos também são inibidos por pH baixo no meio; no entanto, mais importante que o efeito do pH isoladamente é o efeito conjunto deste com teores de MS mais altos, acima de 30% (Woolford, 1984).

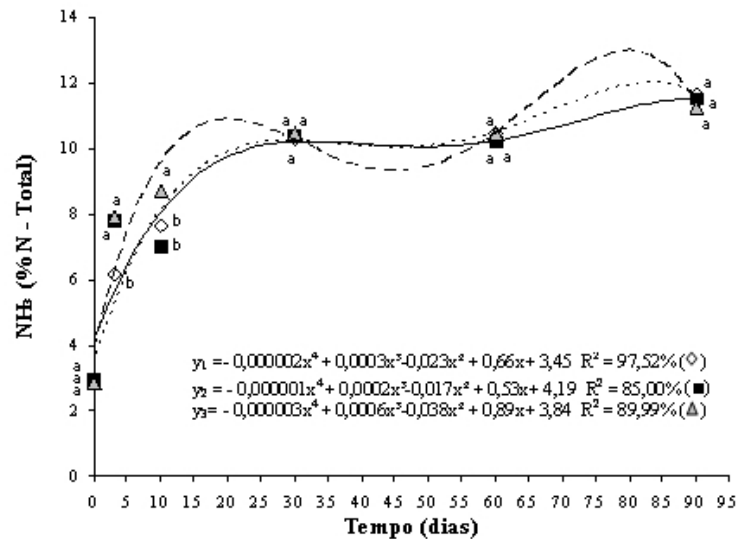
Em geral, silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentam pH mais alto em face da maior produção de ácido acético (Driehuis et al., 1999; Oude Elferink et al., 2001). No presente trabalho, entretanto, não foi possível explicar a queda mais lenta do pH das silagens com inoculante experimental, uma vez que as concentrações de ácido lático, acético e propiônico desta silagem, no início do processo, foram muito similares às das outras silagens. Uma outra explicação poderia ser a conversão do ácido lático a ácido acético e 1,2-propanodiol sob condições anaeróbicas, levando à formação de maior quantidade de 1,2-propanodiol. Este pode ser degradado a ácido propiônico e 1-propanol, resultando no acúmulo de 1-propanol na silagem inoculada. Esta explicação seria plausível, já que a única diferença observada nas silagens inoculadas com inoculante experimental, em relação às outras no início do processo de fermentação, foi referente à produção de ácido propiônico que, nos primeiros 20 dias de fermentação, foi detectada somente naquelas silagens (Oude Elferink et al., 2001).

A concentração de  $\text{NH}_3$  também foi influenciada pela interação ( $P < 0,01$ ) entre inoculante e tempo de abertura dos silos (Tabela 9A). Foi observado aumento mais rápido na concentração de  $\text{NH}_3$  até cerca de 20 dias, sendo esse mais expressivo para as silagem sem inoculante. Desse momento em diante, houve menor aumento em todos os tratamentos. Ao final do processo, as silagens apresentaram os mesmos valores (Figura 6).

Os teores de  $\text{NH}_3$  encontrados nas silagens estão dentro do limite sugerido por Van Soest (1994) para silagem de boa qualidade. Segundo esse autor, valores acima de 10% indicam que o processo de fermentação resultou em quebra excessiva de proteína em amônia. Os valores de nitrogênio amoniacal encontrados no presente trabalho foram muito superiores aos encontrados em silagens de cana de outros trabalhos (Siqueira, 2005; Lima, 2002). Lopes (2005) encontrou valores de pH de 3,7 e de nitrogênio amoniacal de 2,06% para silagens de cana pura com 180 dias de fermentação.

Freitas et al. (2006) também encontraram valores altos de  $\text{NH}_3$  em silagens de cana inoculadas com *L. buchneri*, que foram, em média, de 13,4%, não verificando influência da inoculação com esse microrganismos sobre este parâmetro.

Em geral existe uma correlação entre degradação protéica e produção de  $\text{NH}_3$  em silagens. Esta degradação acontece quando a queda do pH ocorre de forma lenta, causada por fermentação por enterobactérias, enzimas vegetais ou por fermentação por bactérias do gênero *Clostridium*, reduzindo os teores de PB e aumentando as concentrações de  $\text{NH}_3$  (Bolsen, 1995). No entanto, neste trabalho, esta correlação não foi observada (Figura 2 e 6), como também não houve queda lenta do pH em todas as silagens e nem indicativos de fermentação clostrideal. Com tudo isso, não foi possível explicar, com os dados disponíveis, o perfil de produção de  $\text{NH}_3$  ao longo do processo fermentativo.



**FIGURA 6.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação dos teores de nitrogênio amoniacal como porcentagem do N total ( $\text{NH}_3$ ) das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.

Como os aumentos nos constituintes FDN, FDA e PB e a redução nos teores de MS das silagens estão relacionados com perdas de MS, e como no presente trabalho não houve diferença entre essas alterações ocorridas durante a fermentação, sugere-se que as perdas de MS para os três tratamentos sejam similares. Como já mencionado, as perdas de MS estão intimamente ligadas à produção de etanol (48% de perda de MS). Nas silagens inoculadas, a produção de etanol foi menor; entretanto, a produção de ácido acético foi maior. Sabe-se que na fermentação heterolática as perdas de MS por gases são maiores. Assim, apesar da menor produção de etanol, as silagens inoculadas produziram mais ácido acético, igualando as perdas de MS das silagens. Nesse contexto, apesar de não ter sido feita a avaliação de perdas de MS no presente trabalho, sugere-se que

a adição de *L. buchneri* não influenciou as perdas de MS das silagens; no entanto, esses dados devem ser estudados com maior profundidade.

### 3.3 Avaliação da população de BAL, levedura e fungo filamentososo

A adição de inoculantes às silagens de cana-de-açúcar influenciou significativamente ( $P < 0,01$ ) a população de BAL e leveduras durante o processo fermentativo (interação significativa entre inoculantes e tempo de abertura dos silos) (Tabela 10A).

**TABELA 3** – Valores médios da população epifítica do capim-mombaça e das silagens resultantes sem inoculantes e com inoculantes experimental e comercial

Silagem	Forragem			Lev Silagem		
	FF	Lev	BAL	FF	Lev	BAL
	(log ufc/g)					
Sem inoculante	5,4a	5,8a	3,6b	0a	7,17a	8,5b
Experimental	5,4a	6,3a	8,2a	0a	0b	9,9a
Comercial	5,4a	6,1a	8,2a	0a	0b	9,6a

<sup>1</sup> FF= fungos filamentosos; Lev= leveduras e BAL= bactérias do ácido láctico. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

No tempo 0, a forragem sem inoculante apresentou população mais baixa de BAL (3,6 log ufc/g de forragem) do que as silagens inoculadas, o que era esperado já que estas foram inoculadas com  $10^5$  ufc/g de forragem com *L. buchneri* no momento da ensilagem, alcançando população de 8,2 log ufc/g (Tabela 4). A população de leveduras encontrada na cana fresca foi alta (Tabela 4) em comparação com outros trabalhos. Sousa (2006) observou população inicial de leveduras muito próxima à encontrada neste trabalho, 7,78 log ufc/g; já no trabalho de Freitas et al. (2006) a contagem foi menor 5,05 log ufc/g.

Com 3 dias de fermentação ocorreu aumento na população de BAL. Nesse período, a população de BAL nas silagens sem inoculante aumentou tão intensamente que se igualou à das silagens inoculadas. Esse fato é comum e foi

observado em outros trabalhos. Pedroso (2003) também observou um pico na população de BAL em silagem de cana sem inoculante, que inicialmente era de 4,58 log ufc/g de forragem e elevou-se para 7,8 log ufc/g de silagem com 3 dias de fermentação. Por outro lado, naquele trabalho a população de BAL reduziu mais intensamente, chegando a 3,6 log da ufc/g de forragem, e se manteve estável até a abertura dos silos aos 180 dias.

Do terceiro ao décimo dia de fermentação ocorreu nova queda na população de BAL, sendo esta mais acentuada para a silagem sem inoculante. A partir daí, a população permaneceu constante até aos 90 dias, com a população de BAL na silagem controle sendo menor (em torno de 8 log ufc/g de silagem) que das inoculadas (em torno de 10 log ufc/g de silagem) durante todo o processo de fermentação (Figura 7).

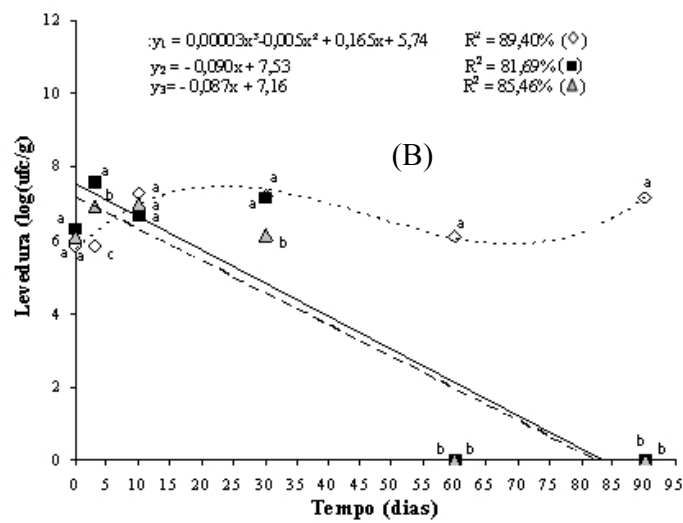
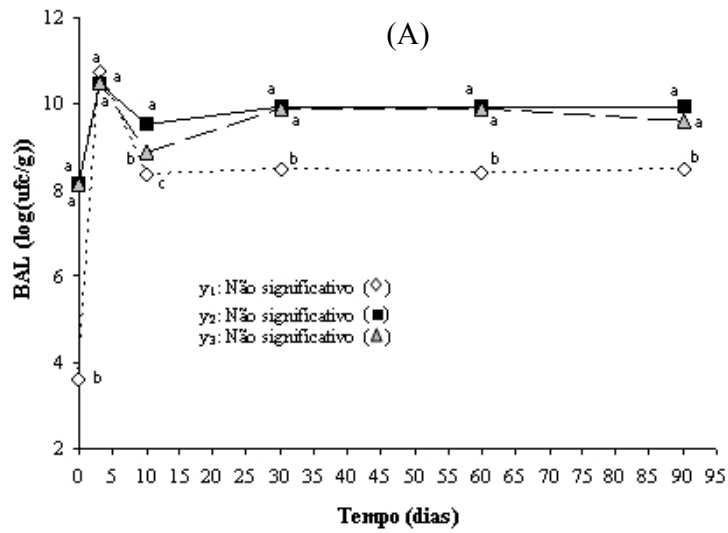
Resultados semelhantes foram encontrados por Bravo-Martins (2005), com médias respectivas de 8,5; 6,5; 8,5 e 6,8 log da ufc/g de silagem para silagens de cana-de-açúcar com 10, 20, 30 e 40 dias de fermentação. Em alguns trabalhos revisados foi verificada redução na população de BAL com o decorrer do processo fermentativo (Pedroso, 2003). Segundo Hammes et al. (1992), na silagem ocorre uma sucessão de BAL. No estágio inicial, as bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* dominam o processo, sendo substituídas por *Leuconostoc*, depois por *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são mais resistentes às condições ácidas. Com o decorrer do processo até as BAL pertencentes ao gênero *Lactobacillus* vão perdendo a viabilidade e alguns microrganismos especializados, tais como *Lactobacillus buchneri*, continuam ativos em um baixo nível (Oude Elferink et al., 2000). Isso explica o fato de a população de BAL nas silagens inoculadas se manter mais alta que a da silagem sem inoculante do décimo dia de fermentação até a abertura dos silos. Sousa (2006) também observou uma alta população de BAL ao final do processo de fermentação de cana-de-açúcar sem aditivo. Neste trabalho, a população inicial

foi de 8,5 log ufc/g de silagem, caindo para 6,49log ufc/g com 3 dias e voltando a subir para 8,12 log ufc/g de silagem aos 110 dias.

A silagem sem inoculante apresentou população de leveduras pouco variável ao longo do processo fermentativo, sendo que, ao final do processo, a contagem de leveduras foi próxima daquela no tempo 0, ou seja, em torno de 8 log ufc/g de silagem (Figura 7). Nessa, a população de leveduras foi alta durante todo o processo de fermentação, não havendo inibição por aneroiose ou acidez (Figura 7), uma vez que elas sobrevivem numa faixa muito ampla de pH e também em anaeroiose. Para a maioria das espécies existentes nas silagens o pH ótimo encontra-se entre 3,5 e 6,5, sendo que algumas espécies são capazes de sobreviver em pH igual ou inferior a 2,0 (McDonald et al., 1991).

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam o intenso crescimento de leveduras em silagens de cana-açúcar sem aditivos (Figura 7). O desenvolvimento de leveduras durante a ensilagem de cana-de-açúcar também foi observado por Bravo-Martins et al. (2006). Estes autores verificaram população de 5,15 a 7,37 log ufc/g e 12 diferentes espécies de fungos leveduriformes (Bravo-Martins, 2005). A população final de leveduras encontrada por Lopes (2005) foi de 5,6 log ufc/g de silagem aos 180 dias de fermentação, porém neste trabalho não foi avaliada a população inicial. Sousa (2006) observou pequena redução na população de leveduras ao longo do perfil, para todas as silagens, com populações variando de 5,6 a 7,7 log ufc/g de silagem.

Não houve diferença entre os dois inoculantes sobre o crescimento de leveduras. A avaliação temporal da contagem de leveduras nas silagens inoculadas resultou em decréscimo linear ( $P < 0,01$ ) de 0,09 log ufc/g por dia no decorrer do processo até aos 90 dias de fermentação, quando a população esteve abaixo do nível detectável ( $< 2,0$  log ufc/g) (Figura 7).



**FIGURA 7.** Representação gráfica do número de bactérias do ácido láctico (A) e leveduras (B) das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.



Essa redução na população de leveduras nas silagens inoculadas com *L. buchneri* também foi quantificada em outros trabalhos com cana-de-açúcar e outras forrageiras, porém não de forma tão intensa. Freitas et al. (2006) observaram redução nas contagens de leveduras de 5,05 log ufc/g na forragem para 3,98 log ufc/g na silagem de cana pura.

Na maioria dos trabalhos com inoculação de *L. buchneri* ocorreu inibição do crescimento de leveduras, o qual é explicado pelo aumento da concentração de ácido acético. Segundo Danner et al. (2003), a atividade antimicrobiana do acetato é causada por moléculas ácidas não dissociadas lipofílicas que penetram na célula da levedura. A dissociação dessas moléculas dentro da célula promove liberação de prótons, acidifica o citoplasma e prejudica o crescimento microbiano. A característica de proteção através da presença do ácido acético ocorre não pela morte dos microrganismos, mas pela inibição do seu crescimento.

No presente estudo, durante todo o processo as silagens inoculadas continham maiores concentrações de ácidos acético, propiônico e láctico e, portanto, de ácidos graxos voláteis totais. As relações entre as produções de ácidos orgânicos e o etanol e o crescimento de leveduras serão discutidas posteriormente.

Fungos filamentosos foram observados na forragem original, com valor médio de 5,4 log ufc/g de forragem (Tabela 4). Ao longo do processo de fermentação a população de fungos filamentosos esteve abaixo do nível detectável (2,0 log ufc/g). Bravo-Martins (2005) também não observou crescimento de fungos filamentosos em silagens de cinco variedades diferentes de cana sem aditivos durante 40 dias de fermentação. Fungos filamentosos são microrganismos aeróbios e, em geral, não toleram pH baixo. Isso explica o fato de não ter sido detectado crescimento de fungos nas silagens de cana-de-açúcar. Apesar de não ter sido detectado crescimento, os fungos podem sobreviver na

forma de esporos, e assim que a silagem entra em contato com o ar, os mesmos se desenvolvem. Na maioria dos trabalhos revisados sobre perfil de fermentação de cana-de-açúcar, a população de fungos filamentosos ao longo do processo não foi avaliada, sugerindo que os mesmos não representam grandes problemas para silagem de cana.

### **3.4 Produção de ácidos graxos voláteis, ácido lático e etanol**

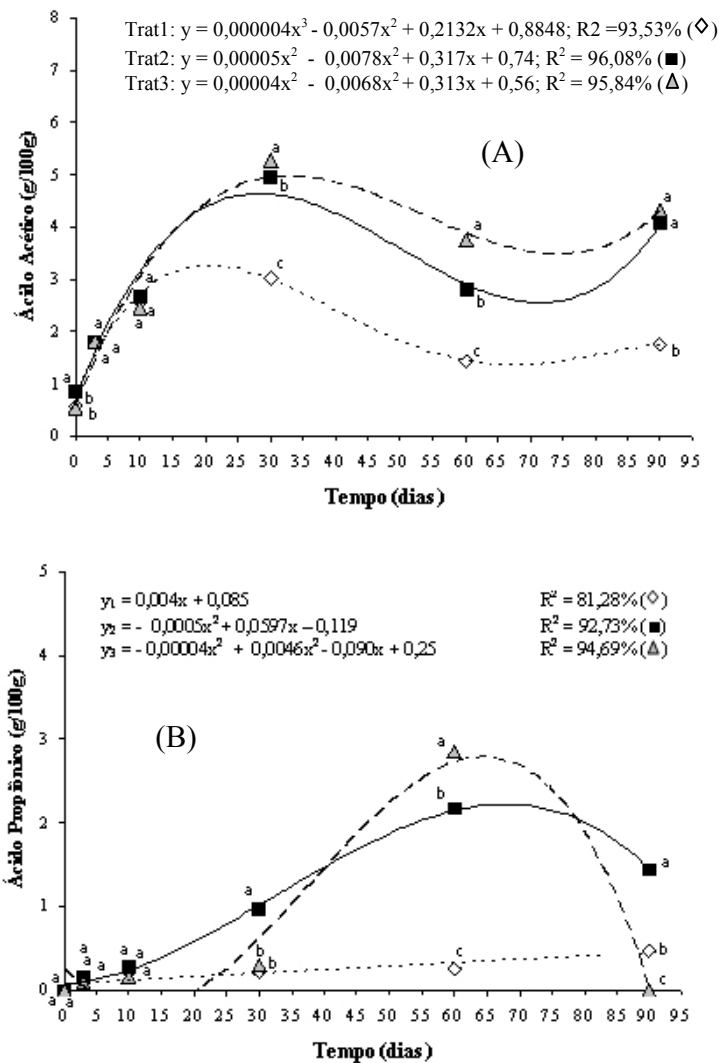
Houve interação significativa entre inoculantes e tempo de abertura dos silos para ácido acético, propiônico e lático e etanol durante o processo de fermentação das silagens (Tabela 11A). Não ocorreu produção de ácido butírico durante a fermentação.

Até o 10º dia de fermentação, a produção de ácido acético em todas as silagens foi semelhante, estando em torno de 3,0 g/100g de MS (Figura 8). Desse ponto em diante, observou-se queda na concentração de ácido acético na silagem sem inoculante. A produção de ácido acético nas silagens inoculadas mostrou perfil semelhante, porém diferente da testemunha. As equações que melhor se ajustaram às variações temporais da produção deste ácido nessas silagens foram polinomiais de terceiro grau. Deste modo, foi observado um pico de produção de aproximadamente 5 g/100 g de MS aos 30 dias, para os dois inoculantes, seguido de redução até aproximadamente 70 dias, quando a concentração de ácido acético foi em torno de 2,5 e 3,5 g/100 g de MS para as silagens com inoculantes experimental e comercial, respectivamente. A partir deste ponto, observou-se tendência de novo aumento até aos 90 dias, quando os silos foram abertos. Para a silagem testemunha o perfil de produção de ácido acético foi similar, porém com resultados inferiores e tendência de estabilização na produção após 60 dias (Figura 8).

Ao final do processo as silagens inoculadas apresentaram maior concentração de ácido acético (4,3g/100g de MS) do que a silagem controle (1,7g/100g de MS) (Figura 8).

A produção de ácido propiônico na silagem sem aditivo aumentou linearmente ( $P < 0,01$ ) com o decorrer do processo de fermentação; no entanto, este aumento ocorreu a uma taxa muito baixa, de apenas 0,004 g/100 g de MS por dia, chegando a um concentração de apenas 0,47g/100 g de MS no momento de abertura dos silos (Figura 8). Nas silagens com inoculante experimental a concentração de ácido propiônico aumentou desde o momento de fechamento dos silos até um valor máximo de 1,66 g/100 g, aos 60 dias, reduzindo novamente até a concentração de 1,44 g/100 g de MS ao final do processo. Com aproximadamente 60 dias também foi observado um pico na concentração de ácido propiônico de cerca de 2,5 g/100 g de MS na silagem inoculada com inoculante comercial. É importante destacar que para esta silagem não houve produção significativa de ácido propiônico antes dos primeiros 20 dias de fermentação e que, ao final do processo, a concentração deste ácido foi 0 (Figura 8).

A produção de ácido láctico ajustou-se a modelos quadráticos (Figura 9). Nas silagens inoculadas, concentrações máximas de ácido láctico foram observadas em torno de 30 dias, sendo de 4 e 3 g/100 g de MS para as silagens com inoculantes comercial e experimental, respectivamente. Nas silagens sem inoculante, o pico de produção se deu antes, com cerca de 20 dias e com concentração menor, em torno de 2,5 g/100 g de MS, reduzindo gradativamente até os 60 dias de fermentação. Após este período foram detectados somente traços de ácido láctico na silagem de cana-de-açúcar sem inoculante (Figura 9).

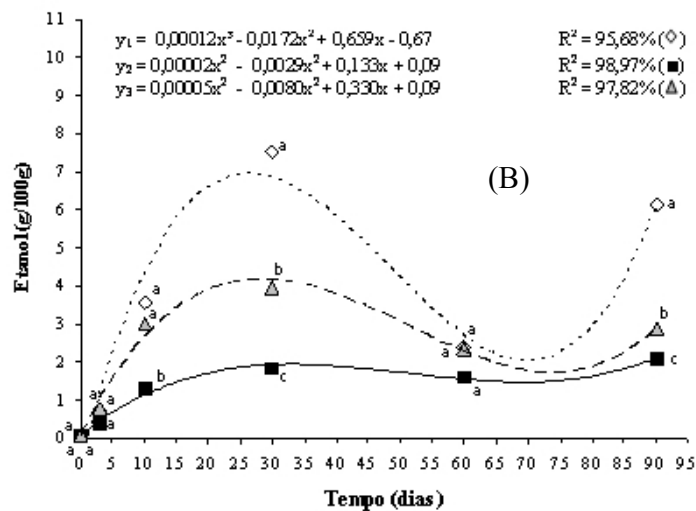
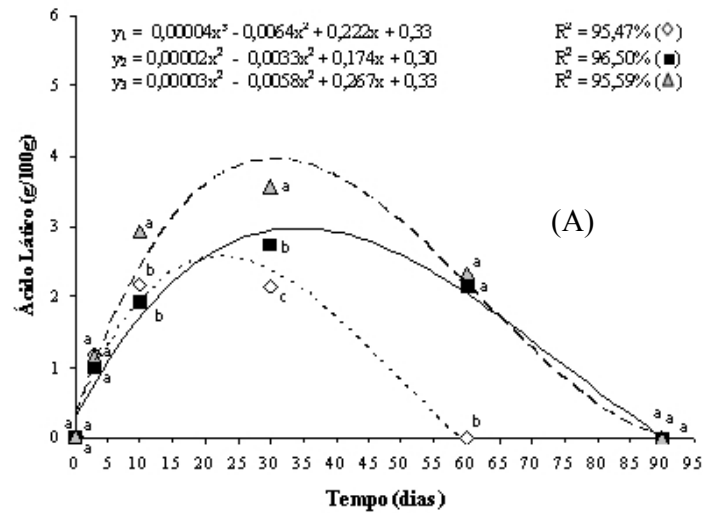


**FIGURA 8.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação da concentração dos ácidos acético (A) e propiônico (B) das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.

Ao longo do processo de fermentação foram observadas maiores concentrações dos ácidos acético, propiônico e láctico nas silagens inoculadas em relação àquela sem inoculante, mostrando a influência da adição de *L. buchneri* sobre os teores destes ácidos. Por ser uma bactéria heterolática, a espécie *L. buchneri*, além de produzir ácido láctico, produz também uma maior quantidade de ácido acético do que bactérias homoláticas. Além disso, a adição desta bactéria pode levar à formação de maior quantidade de 1,2-propanodiol, que pode ser degradado a ácido propiônico e 1- propanol (Oude Elferink et al. 2001).

Para a produção de etanol, observou-se também interação significativa ( $P < 0,01$ ) entre os inoculantes e os tempos de abertura dos silos (Tabela 11A). Em geral, a maior produção de etanol foi observada no terço inicial do processo de fermentação em todas as silagens (Figura 9). A silagem sem inoculante foi a que apresentou a maior concentração de etanol durante todo o processo, seguida pela inoculada com inoculante comercial e pela inoculada com inoculante experimental. Na silagem sem inoculante foi observado um pico de produção de cerca de 7 g/100 g de MS de etanol em torno de 25 dias de fermentação, seguido de redução até ao redor de 70 dias, quando, novamente, houve um aumento na produção, resultando em silagem com 6,14 g/100 g de MS de etanol (Figura 9). Esse valor foi significativamente mais alto do que os das silagens inoculadas com inoculante comercial (2,85 g/100 g de MS) e experimental (2,11 g/100 g de MS) (Figura 9 e Tabela 5).

Na silagem controle, apesar do pico mais alto de produção de etanol, houve redução com o decorrer da fermentação para valores próximos das silagens inoculadas, alcançando os menores teores ao redor dos 70 dias. Essa queda na produção de etanol pode ser decorrente da inibição da população de leveduras pelo próprio produto (“feedback”), ou seja, inibição de leveduras pelo etanol produzido, associada a uma menor concentração de substrato, ou também por volatilização do etanol, não sendo possível sua detecção.



**FIGURA 9.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação da concentração de ácido láctico (A) e etanol (B) das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) em função dos tempos de abertura dos silos.

Pedroso (2003) verificou intensa produção de álcool no início do processo de fermentação, que foi reduzindo até a abertura dos silos. Segundo o autor, as perdas de MS ocorridas nas silagens de cana-de-açúcar pura decorreram da produção de etanol. Como essas perdas não cessaram e a concentração de etanol diminuiu, o autor concluiu que o etanol foi perdido por volatilização. A quantidade de etanol determinada representa o resultado entre a produção, subtraídas as perdas por volatilização. O momento no qual o etanol deixa de acumular na MS da silagem deve ser o ponto em que a taxa de perda supera a de síntese, mas não representa, necessariamente, o término do processo de produção do álcool.

O grande problema da ensilagem de cana-de-açúcar é a intensa fermentação alcoólica por leveduras, acarretando perdas de aproximadamente 49% de MS (McDonald, 1991). Trabalhos realizados recentemente têm encontrado alta correlação negativa ( $r > 0,9$ ) entre produção de etanol e perdas de MS durante a ensilagem (Sousa, 2006; Queiroz, 2006).

Durante o processo fermentativo foi observada menor produção de etanol nas silagens inoculadas com inoculante experimental, seguidas pela silagem contendo inoculante comercial. Estas silagens também exibiram maiores produções de ácidos láctico, acético e propiônico durante o processo. Segundo Danner et al. (2003), durante o processo de fermentação vários compostos são produzidos, sendo difícil a avaliação do potencial de cada composto, separadamente, em inibir microrganismos deterioradores da silagem. No entanto, o ácido acético tem sido classificado como mais eficiente inibidor do crescimento de leveduras, que são as principais responsáveis pela produção de etanol nas silagens de cana.

Algumas leveduras normalmente são controladas por concentrações de ácido acético acima de 5,6 g/litro do meio de cultura (94 mmol/litro) (Woolford, 1984). Uma concentração de 2% de ácido acético na MS, equivalente a 6,7 g do

ácido por litro da fase líquida de uma forragem com 25% de MS, já seria suficiente para o controle de leveduras. No presente trabalho, a concentração de ácido acético nas silagens inoculadas esteve acima de 4% até abertura dos silos, o que explica a redução significativa na população de leveduras ao longo do processo.

Pedroso (2003) verificou que a inoculação com *L. buchneri* na concentração 3log ufc/g resultou em redução de cerca de 50% no teor de etanol (1,9 contra 4,05%) e menor contagem de leveduras (6,14 contra 6,37 log da ufc/g de silagem) em relação ao controle. Porém, em alguns trabalhos este efeito não foi tão pronunciado.

O que se espera com a adição de *L. buchneri* à silagem de cana é o aumento da produção de ácido acético, reduzindo a população de leveduras e, conseqüentemente, a produção de etanol e as perdas de MS nas silagens. No entanto, o que se observa é uma grande variação nos resultados. Em alguns há aumento na produção de ácido acético, redução no crescimento de leveduras e na produção de etanol, com conseqüente redução das perdas de MS. Em outros verifica-se aumento na produção de ácido acético sem, contudo, haver redução no crescimento de leveduras e na produção de etanol

Os teores de ácido acético encontrados no trabalho de Sousa (2006) foram superiores aos valores mínimos de 200 mmol/l indicados para redução em 50% no crescimento de leveduras. No entanto, o autor verificou inibição muito fraca do crescimento de leveduras, sugerindo que, talvez, sejam necessárias maiores quantidades desse ácido para inibição da fermentação, no caso da cana-de-açúcar, pois o mecanismo de controle de crescimento de leveduras envolve perda de energia. Como em silagens de cana-de-açúcar existem altos teores de açúcares solúveis, observam-se rápidos acúmulos de energia pelas leveduras e, talvez, ocorram controles bem mais precisos no uso dessa energia na extrusão dos ácidos orgânicos para fora da célula, monitorando o pH intracelular e



podendo, talvez, garantir a permanência das leveduras no ambiente (McDonald et al., 1991). Considerando esta explicação como plausível, maiores teores de ácido acético no fim do processo fermentativo, quando a concentração de carboidratos solúveis é mais baixa, podem ser mais eficientes em inibir o crescimento de leveduras. É o que pode ter ocorrido no presente experimento, pois a partir de 70 dias de fermentação iniciou-se outro pico de produção dos ácido acético e propiônico.

Os efeitos mais positivos da inoculação com *L. buchneri* são verificados durante a fase de pós-abertura do silo, ou seja, em geral os resultados que normalmente justificam a utilização do *L. buchneri* não estão relacionados com a dinâmica fermentativa. No entanto, o perfil fermentativo vai influenciar diretamente nas modificações que irão ocorrer após a abertura dos silos, como as concentrações dos ácidos produzidos, dos carboidratos solúveis residuais e os valores de pH.

### **3.5 Estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar**

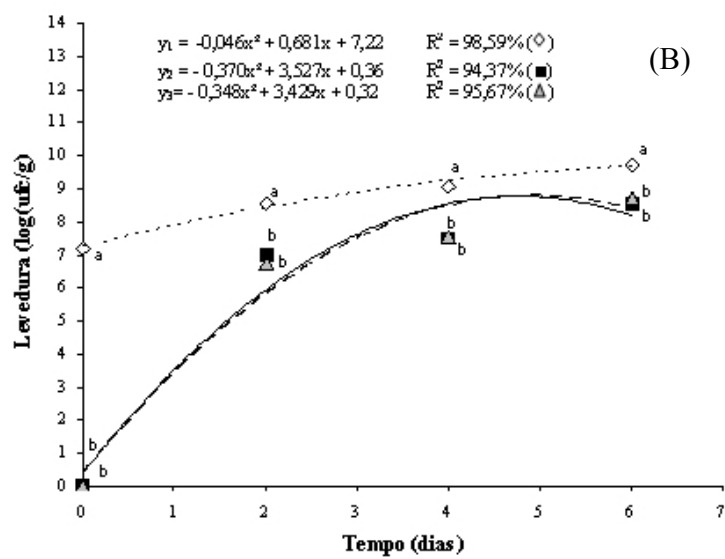
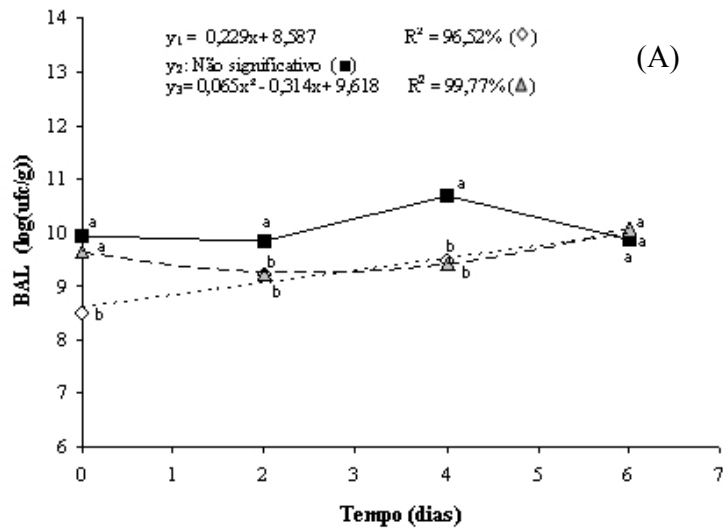
#### **3.5.1 Avaliação das populações de BAL, leveduras e fungos filamentosos**

Foi detectada interação significativa entre os inoculantes e os tempos de avaliação das silagens (Tabela 13A), significando que os aditivos utilizados no momento da ensilagem influenciaram também a população microbiana das mesmas nessa fase. No momento de abertura dos silos, as silagens inoculadas apresentavam população mais alta de BAL. Após dois dias, houve redução desses microrganismos nas silagens com inoculante comercial e aumento nas silagens com inoculante experimental, que foi superior aos outros dois tratamentos. Essa situação persistiu até quatro dias e com seis dias a população de BAL foi semelhante nos três tratamentos (Figura 10). Em geral, as populações de BAL nas três silagens variaram de 8,5 a 11 log da ufc/g de

silagem. Essas populações são consideradas altas. É importante esclarecer que o meio de cultura utilizado para plaqueamento e contagem foi o meio MRS (Tabela 15A), no qual crescem também outros tipos de bactérias não pertencentes ao grupo das BAL. Como o ambiente foi aeróbio, pode ter ocorrido contaminação com outros microrganismos e a contagem de BAL ter sido superestimada.

O perfil de crescimento de leveduras nas silagens sem inoculante aumentou de forma linear, com aumento de 0,04 log ufc/g por dia. As silagens submetidas aos dois inoculantes mostrou comportamento quadrático após a abertura dos silos (Figura 10). No momento da abertura, a contagem de leveduras nas silagens inoculadas esteve abaixo do nível mínimo de detecção (2,0 log ufc/g), porém estas aumentaram rapidamente até uma população máxima de 8,5 log ufc/g de silagem aos quatro dias de exposição ao ar. Entretanto, essa população não alcançou a contagem de leveduras da silagem controle que, inicialmente, já era alta (7,2 log ufc/g), aumentando ainda mais até população máxima de 9,5 log ufc/g de silagem (Figura 10).

A população de fungos filamentosos durante os 6 dias de exposição ao ar das silagens de cana esteve abaixo do nível mínimo detectável (2,0 log ufc/g de silagem). Em nenhuma das silagens estudadas durante esse período foi observado, visualmente, o crescimento destes microrganismos.



**FIGURA 10.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação do número de bactérias do ácido láctico (A) e leveduras (B) das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante (Y<sub>1</sub>) e com inoculantes experimental (Y<sub>2</sub>) e comercial (Y<sub>3</sub>) após a abertura dos silos.

### 3.5.2 Produção de ácidos graxos voláteis, ácido láctico e etanol

Na abertura dos silos não foi detectado o ácido butírico e nas silagens, apenas traços de ácido láctico (Tabela 1). O ácido propiônico foi detectado somente na abertura dos silos (tempo zero de avaliação da estabilidade aeróbia) nas silagens sem inoculante e inoculada com inoculante experimental, sendo as médias de 0,47 e 1,44 g/100 g de MS da silagem, respectivamente (Tabela 1).

**TABELA 4** – Concentração de ácidos acético, propiônico e láctico e etanol nas silagens de cana-de-açúcar sem inoculante e com inoculantes experimental e comercial no momento de abertura dos silos

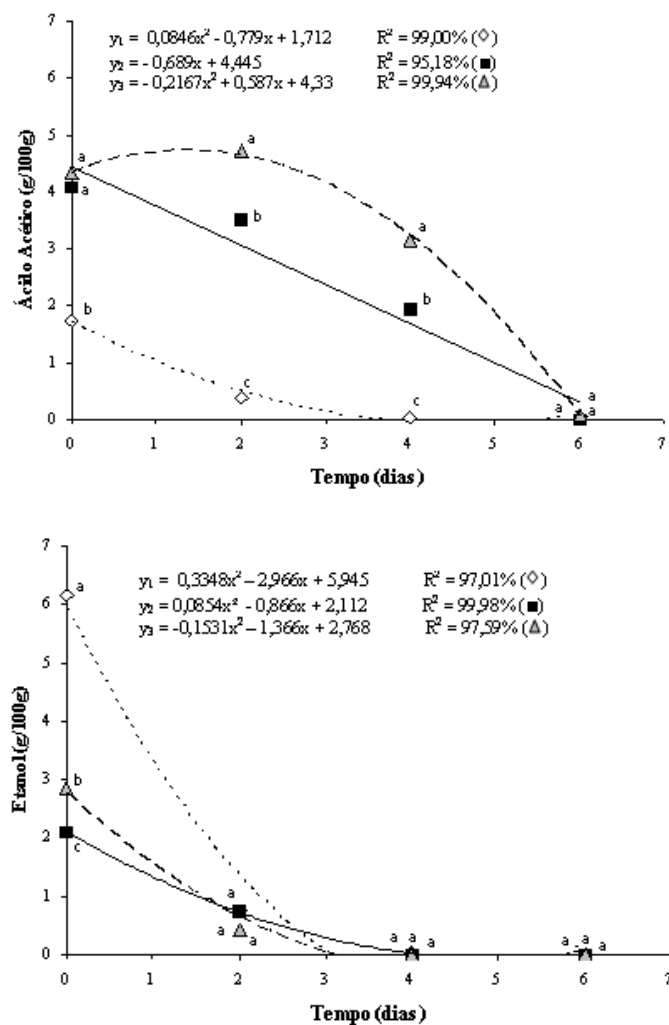
Silagens	Acético	Propiônico	Láctico	Etanol
Sem inoculante	1,74c	0,47b	0,002a	6,14c
Experimental	4,07b	1,44a	0,000a	2,11a
Comercial	4,31a	0,00c	0,002a	2,85b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

Para as concentrações de ácido acético e etanol foi observada interação significativa entre os inoculantes e os tempos de avaliação (Tabela 14A). A inoculação das silagens com *L. buchneri* influenciou nos perfis de ácido acético e etanol das silagens após a abertura dos silos. Com relação ao ácido acético, verificou-se redução na sua concentração após a abertura dos silos nos três tratamentos (Figura 11). Nas silagens sem inoculante foi detectado ácido acético até aproximadamente 4 dias de exposição ao ar. Para as silagens com inoculante experimental, esta redução se deu de forma linear, sendo de 0,7 g/100 g de MS por dia. Já para as silagens com inoculante comercial observou-se resposta quadrática, com concentração máxima de ácido acético de 4,72 g/100 g de MS aos 1,35 dias, reduzindo até a concentração 0 aos 6 dias (Figura 11).

As concentrações de etanol nas silagens sem inoculante e com inoculantes experimental e comercial reduziram até valores mínimos próximos

de 0, respectivamente aos 4,4; 5,0 e 4,5 dias após a abertura dos silos (Figura 11).

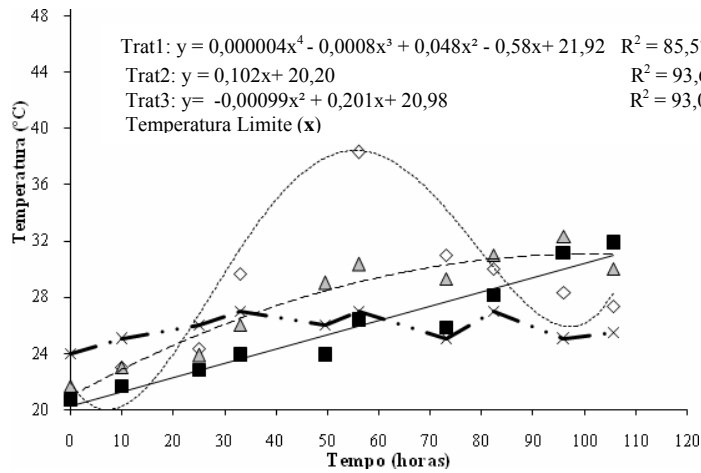


**FIGURA 11.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação da concentração de ácido acético (A) e etanol (B) das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante (Y<sub>1</sub>) e com inoculantes experimental (Y<sub>2</sub>) e comercial (Y<sub>3</sub>) após abertura dos silos.

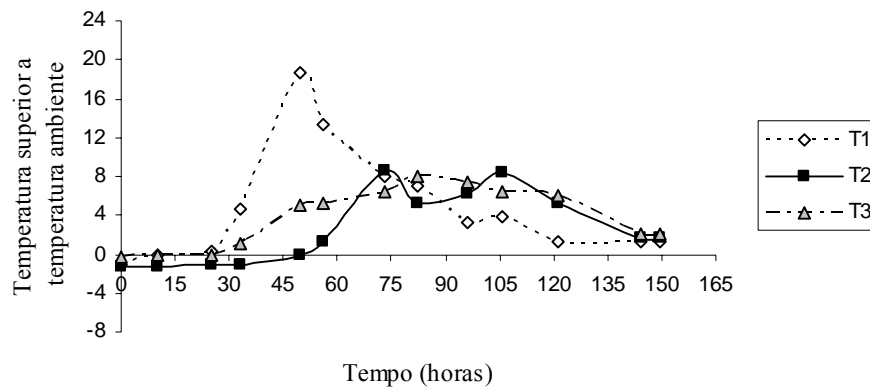
### 3.5.3 Estabilidade aeróbia com base nos valores de temperatura

A Figura 12 mostra o comportamento das temperaturas das silagens e da temperatura limite, considerada como 2 °C acima da temperatura ambiente, para que as silagens percam a estabilidade aeróbia. As silagens sem inoculante e com inoculantes comercial e experimental ultrapassaram 2 graus acima da temperatura ambiente, ou seja, ultrapassaram a curva limite com aproximadamente 24, 33 e 60 horas, respectivamente. A temperatura máxima alcançada pelas silagens, ao longo do processo de deterioração aeróbia, também foi maior para a silagem controle, que atingiu cerca de 19°C, enquanto as silagens inoculadas aqueceram até cerca de 8°C acima da temperatura ambiente durante um período de 150 horas de avaliação (Figuras 12 e 13).

Os valores de estabilidade aeróbia encontrados no presente trabalho foram inferiores aos do trabalho realizado por Pedroso (2003), cujos valores foram de 65 e 75 horas para as silagens controle e inoculada com *L. buchneri* (5 log ufc/g) respectivamente, ou seja, aumento um de 11% no valor da estabilidade com a inoculação. Por outro lado, os valores foram superiores aos relatados por Domingues et al. (2006), que determinaram, para silagem de cana, uma estabilidade aeróbia de apenas 16 horas e a temperatura máxima alcançada pelas silagens foi de 45°C após 32 horas de exposição ao ar. Por sua vez, Queiroz (2006) não verificou influência da adição de *L. buchneri* (4log ufc/g) sobre a estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar, cujos valores médios foram de 40 horas de estabilidade e 42°C de temperatura máxima. Considerando o alto valor de CHOs residuais na silagem de cana, os valores de estabilidade para o presente trabalho estão dentro da faixa esperada.



**FIGURA 12.** Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação dos valores de temperatura em grau °C das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante ( $Y_1$ ), com inoculante experimental ( $Y_2$ ) e com inoculante comercial ( $Y_3$ ) após a abertura dos silos.



**FIGURA 13.** Representação gráfica das diferenças entre a temperatura dos silos e a temperatura ambiente das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante (Trat 1), com inoculante experimental (Trat 2) e com inoculante comercial (Trat 3) após a abertura dos silos.

Em outros trabalhos, com outras forrageiras, a influência da inoculação com *L. buchneri* sobre a estabilidade foi maior. Driehuis et al. (1999), avaliando a adição de microrganismos na dose de 6 log ufc/g, obtiveram silagem de milho estável por mais de 792 horas, sendo que a silagem controle permaneceu estável por apenas 43 horas. Driehuis et al. (2001) obtiveram silagens de capim-azevém (*Lolium perenne* L.) emurchecido, com estabilidade superior a 480 horas com a aplicação de *L. buchneri* em taxa de 5 log ufc/g.

Esses valores de estabilidade foram citados apenas para mostrar a eficiência da adição de *L. buchneri* sobre a mesma, pois não é conveniente fazer comparações de dados de estabilidade aeróbia entre forrageiras distintas. Deve-se levar em conta diversos fatores, como os teores de MS e de carboidratos solúveis residuais, a concentração dos ácido acético e butírico e a contagem de leveduras nas silagens (McDonald et al., 1991), além do fato de existirem diferenças entre as metodologias utilizada nos experimentos.

As silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentaram, no momento de abertura dos silos, teores mais altos de ácido acético; menor teor de etanol; maior população de BAL e menor contagem de leveduras; além disso, na silagem inoculada com o inoculante experimental foi observada uma maior concentração de ácido propiônico. Com o aumento do tempo de exposição da silagem ao ar foi observada redução na concentração dos ácidos acético e propiônico e do etanol e aumento da população de leveduras e nos valores de pH.

Segundo Danner et al. (2003), vários compostos são produzidos durante a fermentação, sendo difícil a avaliação do potencial de cada composto separadamente em inibir microrganismos deterioradores de silagem em experimentos. Entretanto, os autores verificaram que o ácido acético foi o composto mais efetivo em aumentar a estabilidade aeróbica de silagens. Segundo Woolford, algumas leveduras são normalmente controladas por



concentrações de ácido acético acima de 5,6 g/litro do meio de cultura (94 mmol/litro) (Woolford, 1984).

O crescimento de microrganismos pode ser evitado por ácidos orgânicos fracos, como os ácidos fórmico, acético e propiônico, que têm a capacidade de se difundir pela membrana plasmática na sua forma não dissociada, diminuindo o pH do citoplasma e afetando, negativamente, a glicólise e o sistema de transporte ativo das células, em um processo dependente do pH e da concentração de açúcares do meio. Após abertura do silo o pH tende a aumentar e nessas condições, o ácido acético é mais estável que o láctico, aumentando sua eficiência em relação ao ácido láctico (Danner et al., 2003).

O efeito dos ácidos acético e propiônico em inibir o crescimento das leveduras foi observado no trabalho realizado por Moon (1983) com culturas *in vitro*. A partir do estudo de sinergismo entre os compostos, o autor verificou que altas concentrações de ácido láctico e baixas de ácido acético aumentaram dramaticamente o crescimento das leveduras. Além disso, a mistura dos ácidos acético e propiônico (concentração acima de 10 mM) foi, dentre as misturas estudadas, a mais eficiente em reduzir a taxa de crescimento das leveduras (50% de inibição).

Com base no que foi mencionado, conclui-se que a inoculação das silagens de cana com bactérias da espécie *L. buchneri* resultou em silagens com maior estabilidade aeróbia, sendo que o ácido acético foi o principal responsável por tal fato. Dos tratamentos avaliados no presente estudo, a silagem inoculada com inoculante experimental foi a que apresentou a maior estabilidade aeróbia, o que pode ser explicado pela maior concentração de ácido propiônico no momento da abertura dos silos, uma vez que o teor de ácido acético e a contagem de leveduras foram semelhantes aos da silagem com inoculante comercial. Hill (1989) isolou três espécies de *Lactobacillus plantarum* de milho, alfafa e sorgo que foram, posteriormente, utilizadas como inoculantes nas

respectivas espécies forrageiras, verificando que a estirpe dominante em cada silagem foi a natural de cada forrageira. O autor concluiu que a cepa de um determinado inoculante cresce melhor na forrageira em que foi encontrada.

Talvez essa cepa de *L. buchneri* pertencente ao inoculante experimental do presente estudo, que foi isolada da própria cana-de-açúcar, apresente alguma outra característica que melhore a estabilidade aeróbia e que necessite ser melhor estudada.

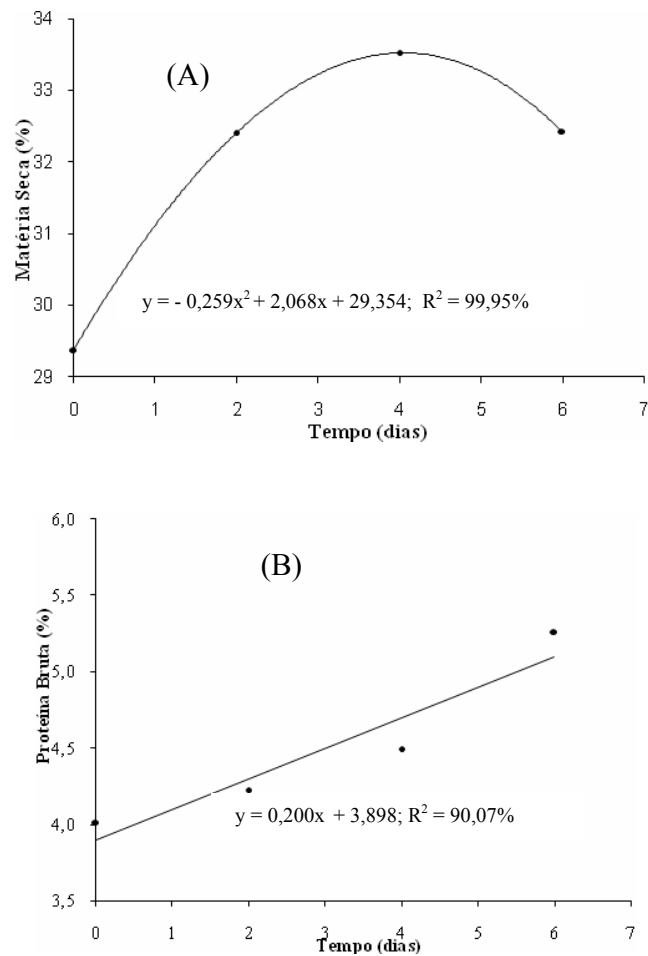
Para cada tratamento, substituindo os tempos em que as silagens perderam a estabilidade nas equação de crescimento de leveduras (Figura 10), obteve-se população de leveduras de 8,0; 8,4 e 8,5 log da ufc/g de silagem, mostrando que as silagens perderam a estabilidade quando as populações estavam próximas desses valores para as três silagens. Estes dados confirmam a afirmação feita por Bolsen (1995) de que uma vez que as leveduras ou bactérias alcancem uma população de  $10^7$  a  $10^8$  ufc ou os fungos filamentosos alcancem  $10^6$  a  $10^7$  ufc/g, a silagem começará a aquecer e componentes digestíveis como açúcares e produtos de fermentação irão ser rapidamente perdidos.

#### **3.5.4 Variações na composição química durante a fase aeróbica**

Após a abertura dos silos foram observadas variações significativas nos teores de MS, PB, CHOs,  $\text{NH}_3$  e pH (Tabelas 12 e 13A). Para os teores de MS, PB, CHO e pH não foi observada interação significativa entre inoculantes e tempo de exposição ao ar ( $P>0,05$ ). Portanto, os tratamentos mostraram o mesmo comportamento ao longo do processo de fermentação.

Após a abertura dos silos, notou-se resposta quadrática ( $P<0,01$ ) dos teores de MS das silagens de cana-de-açúcar em função do tempo de exposição ao ar, com aumento até o valor máximo de 33,5%, aos 4 dias, seguido de redução até os 6 dias (Figura 14). Para os teores de PB foi observado um

aumento linear ( $P < 0,01$ ) com o decorrer do tempo, com aumento de 0,2 unidades percentuais por dia (Figura 14).



**FIGURA 14.** Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação dos teores de MS (A) e PB (B) (média das silagens) das silagens de cana-de-açúcar após abertura dos silos.

Com relação à concentração de CHOs, houve redução de 0,74 g/kg de MS por dia após a abertura dos silos até aos 6 dias de exposição ao ar (Figura 15). Na tabela 2, verifica-se que as silagens inoculadas apresentaram teores de CHOs semelhantes ( $P>0,05$ ) e superiores aos da silagem testemunha.

**TABELA 5** – Teores de CHOs (g/kg de MS) das silagens de cana-de-açúcar submetidas sem inoculante e com inoculantes experimental e comercial após abertura dos silos.

Silagens	Médias
Sem inoculante	13,1855 b
Experimental	18,4815 a
Comercial	19,1909 a

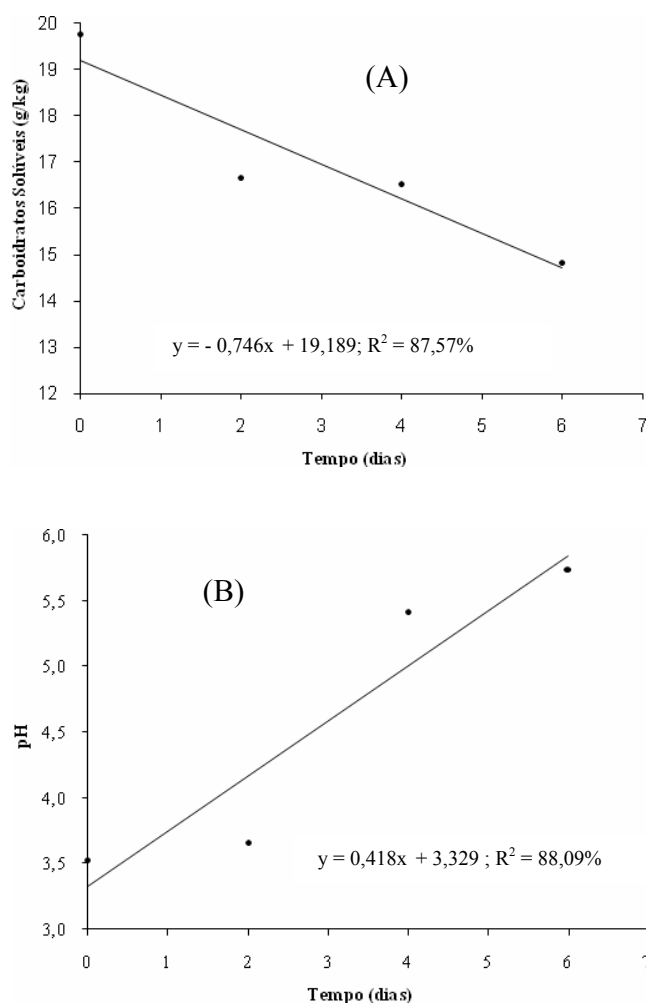
Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P<0,05$ )

Com relação aos valores de pH, as três silagens apresentaram comportamentos semelhantes, com aumento linear de 0,4 por dia no período de avaliação da estabilidade aeróbia (Figura 15).

O aumento nos valores de pH das silagens após a abertura dos silos ocorreu porque houve consumo dos ácidos orgânicos por leveduras e/ou outros microrganismos. Na silagens inoculadas a população de leveduras foi menor; porém, nestas possivelmente a população de BAL da espécie *L. buchneri* foi mais alta e estas podem metabolizar o ácido láctico a ácido acético, provocando aumento do pH. Além disso, outras bactérias que têm habilidade para metabolizar o ácido láctico podem ter colonizado a silagem. Com aumento do pH, surgem outros microrganismos que estavam inativos na silagem. No caso das silagens inoculadas, o aumento do pH, resultante da redução dos ácidos orgânicos, forneceu condições para o desenvolvimento das leveduras.

Leveduras e alguns fungos filamentosos são os microrganismos mais importantes envolvidos na deterioração aeróbica da silagem. Entretanto, outros microrganismos, como bactérias do gênero *Bacillus*, BAL e bactérias ácido

acéticas, metabolizam componentes das silagens como CHOs, proteínas e produtos do metabolismo (Jobim e Gonçalves, 2003; McDonald, 1991; Oude Elferink et al., 2000).

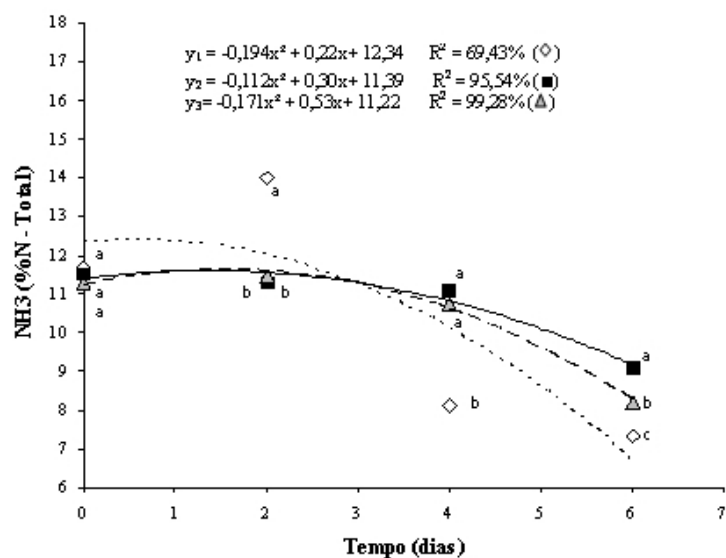


**FIGURA 15.** Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação dos valores de carboidratos solúveis (A) e pH (B) (média das silagens) das silagens de cana-de-açúcar após abertura dos silos.

O aumento dos teores de MS resultou principalmente da desidratação do material que ficou seis dias exposto ao ar. Com aproximadamente 4 dias, houve tendência de redução, que pode ser explicada pelo consumo dos CHOs e pela formação da chamada água de metabolismo (Woolford, 1984).

A elevação dos teores de PB não era esperada; porém, uma explicação provável seria síntese de proteína microbiana, já que após abertura dos silos o crescimento microbiano foi intenso, ou o aumento do teor de MS, uma vez que os teores protéicos são calculados com base nos teores de MS.

As variações nas concentrações de  $\text{NH}_3$  mostraram resposta quadrática ( $P < 0,01$ ) em função do tempo de abertura dos silos, com valores máximos de 12,4; 11,5 e 10,8% aos 0, 6; 1,3 e 1,4 dias, respectivamente para as silagens testemunha e inoculadas com inoculantes experimental e comercial (Figura 11). Esperava-se que houvesse aumento nos teores de  $\text{NH}_3$  nas silagens após abertura dos silos devido à degradação de compostos nitrogenados por microrganismos de deterioração aeróbica, como leveduras e algumas bactérias. Isso realmente pode ter ocorrido, porém esse comportamento não foi detectado porque a amônia é um componente muito volátil, perdendo-se durante a exposição ao ar. Esta mesma explicação se aplica à redução dos teores de etanol.



**FIGURA 25.** Representação gráfica, equações de regressão e coeficientes de determinação dos teores de  $\text{NH}_3$  das silagens de cana-de-açúcar sem inoculante ( $Y_1$ ) e com inoculantes experimental ( $Y_2$ ) e comercial ( $Y_3$ ) após a abertura dos silos.

#### 4. CONCLUSÕES

A adição de *L. buchneri* às silagens de cana-de-açúcar é recomendável, pois resulta em maiores produções de ácido acético e propiônico, reduzindo a população de leveduras e, assim, a produção de etanol ao longo do processo.

Não foram observadas diferenças entre os inoculantes com relação a estes efeitos na silagem durante o processo de fermentação.

Os principais microrganismos envolvidos com a deterioração aeróbia nas silagens de cana foram as leveduras

Os dois inoculantes aumentaram a estabilidade aeróbia das silagens, porém o inoculante comercial foi mais eficiente.

Esta cepa de *L. buchneri* pertencente ao inoculante experimental deve ser mais bem avaliada para que possa ser recomendada como inoculante para cana-de-açúcar.



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. 13. ed. Washington, DC: AOAC, 1980. 1015 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. 15. ed. Virginia: AOAC, 1990. v. 1, 648 p.

BOIN, C.; TEDESCHI, L. O. Cana-de-açúcar na alimentação de gado de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 5., 1993, Piracicaba, 1993. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1993. p. 107-126.

BOLSEN, K. K. Silage: basic principles. In: BARNES, R. F.; MILLER, D. A.; NELSON, C. J. **Forages**. 5. ed. Ames: Iowa State University, 1995. p. 163-176.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Normas climatológicas (1961-1990)**. Brasília: MA/SNI/DNMET, 1992. 84 p.

BRAVO-MARTINS, C. E. C. **Identificação de leveduras envolvidas no processo de ensilagem de cana-de-açúcar e utilização de extratos vegetais como seus inibidores**. 2005. 148 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRAVO-MARTINS, C. E. C.; CARNEIRO, H.; CASTRO-GOMES, R. J.; FIGUEIREDO, H. C.; SCHWAN, R. F. Chemical and microbiological evaluation of ensiled sudar cane with diferent additives. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 499-504, Dec. 2006.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Recomendação para uso de corretivos e fertilizantes de Minas Gerais: 5 aproximação**. Viçosa, MG, 1999. 359 p.

CORRÊA, L. A.; POTT, E. B. Silagem de capim. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 2., 2001, Lavras. **Anais...** . Lavras: UFLA, 2001. p. 255-271.

DOMINGUES, F. P.; OLIVEIRA, M. D. S.;SIQUEIRA, G. R.; ROTH, A. P. T. P.; SANTOS, J.; ANDRADE, A. T.; MONTEIRO, R. R.; ROTH, M. T. P.; MAGARIO, F. B. Efeitos das doses de cal (cao) microprocessada e do tempo

após o tratamento sobre a estabilidade aeróbia e dinâmica de microrganismos da cana-de-açúcar in natura. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. 1CD-ROM.

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**, Oxford, v. 4, n. 87, p. 583–594, Oct. 1999.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 330–343, Dec. 2001.

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. . Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Wahington, v. 69, n. 1, p. 562-567, Jan. 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 225-258.

FREITAS, A. W. P.; PEREIRA, J. C.; ROCHA, F. C.; COSTA, M. G.; LEONEL, F. P.; RIBEIRO, M. D. Avaliação da qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar com aditivos microbianos e enriquecida com resíduo da colheita de soja1 **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 38-47, jan./fev. 2006

HAMMES, W. P.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. H The genus *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Ed). **The Prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. e. 1, p. 719-767.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D. Microbiologia de Forragens conservadas. In: VOLUMOSOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES, 1., 2003, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 1995. p. 1-26.

KUNG Jr., L. Aditivos microbianos e químicos para silagem: Efeitos na fermentação e resposta animal. In: WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM, 2., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 53-74.

LIMA, J. A.; EVANGELISTA, A. R.; ABREU, J. G.; SIQUEIRA, G. R.; SANTANA, R. A. V. Silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) enriquecida com uréia ou farelo de soja. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. 1CD-ROM.

LIMA, M. L. M.; MATTOS, W. R. S. Cana-de-açúcar na alimentação de bovinos leiteiros. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 5., 1993, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1993. p. 77-105.

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

MOLINA, L. R.; FERREIRA, D. A.; GONÇALVES, L. C.; NETO, A. G. C.; RODRIGUEZ, N. M. Padrão de fermentação da silagem de cana-de-açúcar submetida a diferentes tratamentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. CD-ROM

MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid-tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 454-460, 1983.

MUCK, R. Inoculant of silage and its effects on silage quality. In: INFORMATIONAL CONFERENCE WITH DAIRY AND FORAGE INDUSTRIES, 1996, **Proceedings...** US: Dairy forage Research, 1996. p. 43-52.

NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H.; SAKAGUCHI, E. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 800-807, 2003

NUSSIO, L. G.; SCHMIDT, P.; PEDROSO, A. F. Silagem de cana-de-açúcar In: FORRAGICULTURA E PASTAGENS: temas em evidência – sustentabilidade, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: Editora UFLA, 2003. p. 49-72

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHAL, J. C. Silage fermentation processes and their manipulation. In: FAO ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE: Silage making in the tropics with

emphasis on smallholders, 1999, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2000. p. 17-30.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J. A.; SPOELSTRA, S. F.; FABER, 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, Jan. 2001.

PEDROSO, A. F. **Aditivos químicos e microbianos no controle de perdas e na qualidade de silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2003. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PEDROSO, A. F. **Aditivos químicos e microbianos no controle de perdas e na qualidade de silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2003. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PEDROSO, A. F.; NUSSIO, L. G.; PAZIANI, S. F.; LOURES, D. R. S.; IGARASI, M. S.; COELHO, R. M.; PACKER, I. H.; HORII, J.; GOMES, L. H. Dinâmica da fermentação e da microflora epífita em silagem de cana-de-açúcar. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 62, n. 5, p. 427-432, set./out. 2005.

PLAYNE, M. J.; McDONALD, P. The buffering constituents of herbage. **Journal of Food Science and Agriculture**, Barking, v. 17, n. 6, p. 264-268, June 1966.

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 um volumoso tradicional**. 2006. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba

RANJIT, N. K.; KUNG JUNIOR., L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 83, n. 3, p. 526-535, Mar. 2000.

ROTZ, C. A.; MUCK, R. E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: \_\_\_\_\_. **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 1994. p. 828-868.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos.** Viçosa/MG:UFV, 1990. 166 p.

SIQUEIRA, G. R. **Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) ensilada com aditivos químicos e bacterianos.** 2005. 91 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SOUSA, D. P. **Avaliação de aditivos químicos e microbianos como inibidores da síntese de etanol em silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*).** 2006. 142 p. Tese (Doutorado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba

VALADARES FILHO, S. C. **Digestibilidade aparente e locais de digestão da matéria seca, energia e carboidratos de feno de soja perene.** Belo horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 1081. 88 p.

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

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation.** New York: Marcel Dekker, 1984. 350 p.

## **ANEXOS**

	Página
<b>Tabela 1A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis MS, PB, FDN e FDA das silagens de capim-mombaça ..... 169
<b>Tabela 2A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis HEM, CHO, pH e NH <sub>3</sub> das silagens de capim-mombaça..... 169
<b>Tabela 3A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis populações de BAL, LEV e FF das silagens de capim-mombaça..... 169
<b>Tabela 4A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis ácidos acético, propiônico, butírico e láctico das silagens de capim-mombaça.. 170
<b>Tabela 5A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis MS, PB, pH, CHOs das silagens de capim-mombaça após a abertura dos silos... 170
<b>Tabela 6A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis TEMP, FF, NH <sub>3</sub> , LEV e BAL das silagens de capim-mombaça após abertura dos silos..... 171
<b>Tabela 7A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis ácidos acético, propiônico, butírico, e láctico das silagens de capim-mombaça após abertura dos silos..... 171
<b>Tabela 8A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis MS, PB, FDN e FDA das silagens de cana-de-açúcar 172
<b>Tabela 9A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis HEM, CHO, pH e NH <sub>3</sub> das silagens de cana-de-açúcar..... 172
<b>Tabela 10A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis populações de FF, LEV e BAL das silagens de cana-de-açúcar..... 172
<b>Tabela 11A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis ácidos acético, propiônico e láctico e etanol das silagens de cana-de-açúcar..... 173
<b>Tabela 12A</b>	Resumo das análise de variância das variáveis MS, PB, pH, CHOs das silagens de cana-de-açúcar após abertura dos silos... 173

<b>Tabela 13A</b>	Resumo das análises de variância das variáveis TEMP, NH <sub>3</sub> , LEV e BAL das silagens de cana-de-açúcar após abertura dos silos .....	174
<b>Tabela 14A</b>	Resumo da Análise de Variância das variáveis acético e etanol das silagens de cana-de-açúcar após abertura dos silos.	174
<b>Tabela 15 A</b>	Composição química dos meios MRS, DRBC e Yepg usados para contagem dos microrganismos	175



**TABELA 1A.** Resumo das análises de variância das variáveis MS, PB, FDN e FDA das silagens de capim-mombaça

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		MS	PB	FDN	FDA
Tempo (T)	5	40,0767**	3,6042**	137,6014**	54,7917**
Silagem (Si)	2	4,3000**	0,1903	4,5103	36,5291**
T x Si	10	33,6627**	0,2809	2,8087	16,9706**
Erro	36	1,4717	0,23498	6,1540	3,9883
Total	53				
Média Geral		27,62	6,97	75,91	45,47
CV (%)		4,39	6,95	3,27	4,39

(\*\*) Significativo ao nível de probabilidade de 1% pelo teste F.

**TABELA 2A.** Resumo das análises de variância das variáveis HEM, CHO, pH e NH<sub>3</sub> das silagens de capim-mombaça

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio			
		HEM	CHO	pH	NH <sub>3</sub>
Tempo (T)	5	33,5370**	584,8438**	1,6925**	2.087,7023**
Silagem (Si)	2	17,4029	0,7080	0,3338**	121,0863**
T x Si	10	15,5559*	9,0783**	0,0447	63,6299**
Erro	36	6,2762	1,9816	0,0230	0,4439
Total	53				
Média Geral		30,44	7,32	4,79	25,81
CV (%)		8,23	19,23	3,17	2,58

(\*), (\*\*) Significativo aos níveis de probabilidade de 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

**TABELA 3A.** Resumo das análises de variância das variáveis população de BAL, LEV e FF das silagens de capim-mombaça

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio		
		BAL	LEV	FF
Tempo (T)	5	4,6839**	10,9713**	7,2093**
Silagem (Si)	2	1,3438**	11,3461**	3,8265**
T x Si	10	1,4670**	4,0189**	5,2714**
Erro	36	0,0642	0,0500	0,1535
Total	53			
Média Geral		9,16	5,36	4,45
CV (%)		2,77	4,17	8,80

(\*\*) Significativo ao nível de probabilidade de 5% pelo teste F.

**TABELA 4A.** Resumo das análises de variância das variáveis ácidos acético, propiônico, butírico e láctico das silagens de capim-mombaça

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio			
		Acético	Propiônico	Butírico	Láctico
Tempo (T)	5	9,6036**	0,0145**	10,4928**	4,4116**
Silagem (Si)	2	1,5788**	0,0007	0,4918**	5,5699**
T x Si	10	0,3968**	0,0008*	1,1327**	0,5269**
Erro	36	0,1073	0,0003	0,6492	0,0750
Total	53				
Média Geral		1,88	0,06	0,32	1,10
CV (%)		17,41	29,77	42,11	24,93

(\*), (\*\*) Significativo aos níveis de probabilidade de 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

**TABELA 5A.** Resumo das análises de variância das variáveis MS, PB, pH, CHOs das silagens de capim-mombaça após abertura dos silos

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio			
		MS	PB	pH	CHOs
Silagem(Si)	2	8,5679	0,2678	0,3919	2,5666*
Erro a	6	4,0373	0,1647	0,2062	0,3002
Tempo (T)	3	19,4579**	0,5647	9,4736**	0,6092
T x Si	6	10,3774**	0,2458	0,3129	3,6967**
Erro b	18	2,3481	0,3500	0,1518	0,3337
Total	35				
Média Geral		30,06	6,72	5,39	3,79
CV <sub>1</sub> (%)		6,68	6,04	8,42	14,45
CV <sub>2</sub> (%)		5,10	8,80	7,23	15,24

(\*), (\*\*) Significativo aos níveis de probabilidade de 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

**TABELA 6A.** Resumo da Análise de Variância das variáveis TEMP, FF, NH<sub>3</sub>, LEV e BAL das silagens de capim-mombaça após abertura dos silos

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio				
		TEMP	FF	NH <sub>3</sub>	LEV	BAL
Silagem (Si)	2	2,6806*	32,0257**	206,2838**	7,1554**	0,0075
Erro a	6	0,4120	0,0396	0,7604	0,0731	0,0768
Tempo (T)	3	3,2861**	64,4398**	163,8775**	33,5615**	2,7722**
T x Si	6	0,2250*	11,2952**	82,9442**	6,1860**	0,3944**
Erro b	18	0,0787	0,1741	0,5716	0,0797	0,0612
Total	35					
Média Geral	2,91	20,23	2,91	34,16	5,92	9,02
CV <sub>1</sub> (%)	6,84	3,14	6,84	2,55	4,57	3,07
CV <sub>2</sub> (%)	14,32	1,37	14,32	2,21	4,77	2,74

(\*), (\*\*) Significativo aos níveis de probabilidade de 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

**TABELA 7A.** Resumo das análises de variância das variáveis ácido acético, propiônico, butírico, e láctico das silagens de capim-mombaça após abertura dos silos

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio			
		Acético	Propiônico	Butírico	Lático
Silagem (Si)	2	0,4690*	0,0099*	0,9074**	2,1731**
Erro a	6	0,0849	0,0014	0,0365	0,0508
Tempo (T)	3	12,5581**	0,0128**	0,5857**	1,1977**
T x Si	6	0,4563*	0,0021*	0,0580	1,1866**
Erro b	18	0,1300	0,0005	0,0465	0,0264
Total	35				
Média Geral		1,70	0,07	0,93	0,80
CV <sub>1</sub> (%)		17,14	54,36	20,62	28,19
CV <sub>2</sub> (%)		21,21	33,69	23,26	20,30

(\*), (\*\*) Significativo aos níveis de probabilidade de 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

**TABELA 8A.** Resumo das análises de variância das variáveis MS, PB, FDN e FDA das silagens de cana-de-açúcar

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio			
		MS	PB	FDN	FDA
Tempo (T)	5	8,9983**	0,6784**	48,5852**	59,7419**
Silagem (Si)	2	0,6928	0,4520*	19,5706*	8,7917
T x Si	10	1,0537	0,3920**	5,6634	9,7921*
Erro	36	1,5252	0,1391	5,7274	3,5256
Total	53				
Média Geral		27,96	3,42	60,78	33,76
CV (%)		4,42	10,91	3,94	5,56

(\*), (\*\*) Significativo aos níveis de probabilidade de 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

**TABELA 9A.** Resumo das análises de variância das variáveis HEM, CHO, pH e NH<sub>3</sub> das silagens de cana-de-açúcar

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio			
		HEM	CHOs	pH	NH <sub>3</sub>
Tempo (T)	5	105,8231**	100055,4836**	6,4304**	88,4233**
Silagem (Si)	2	50,7788**	179,3177**	0,9284**	0,8087*
T x Si	10	23,6478**	116,0354**	0,5764**	0,9129**
Erro	36	1,4166	7,8081	0,0022	0,1999
Total	53				
Média Geral		27,01	88,44	4,06	8,36
CV (%)		4,41	3,16	1,17	5,34

(\*), (\*\*) Significativo aos níveis de probabilidade de 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

**TABELA 10A.** Resumo das análises de variância das variáveis populações de FF, LEV e BAL das silagens de cana-de-açúcar

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio do Erro		
		FF	LEV	BAL
Tempo (T)	5	NS	48,8792**	15,1866**
Silagem (Si)	2		26,5746**	14,7708**
T x Tr	10		13,1804**	2,5770**
Erro	36		0,0837	0,0594
Total	53			
Média Geral			5,19	9,05
CV (%)			5,57	2,69

(\*\*) Significativo ao nível de probabilidade de 1% pelo teste F.

**TABELA 11A.** Resumo das análises de variância das variáveis ácidos acético, propiônico e lático e etanol das silagens de cana-de-açúcar

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio			
		Acético	Propiônico	Lático	Etanol
Tempo (T)	5	14,9471**	3,6915**	12,2318**	25,9175**
Silagem (Si)	2	7,0764**	1,7727**	2,5062**	21,6644**
T x Si	10	1,5207**	1,1632**	0,9774**	4,4140**
Erro	36	0,0216	0,0129	0,0271	0,1222
Total	53				
Média Geral		2,580	0,538	1,299	2,265
CV (%)		5,69	21,12	12,66	15,43

(\*\*) Significativo ao nível de probabilidade de 1% pelo teste F.

**TABELA 12A.** Resumo das análises de variância das variáveis MS, PB, pH, CHOs das silagens de cana-de-açúcar após abertura dos silos

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio			
		MS	PB	pH	CH
Silagem (Si)	2	5,9648	1,0785	0,3854	129,2306*
Erro a	6	5,8443	0,2871	0,1879	19,7884
Tempo (T)	3	28,7806**	2,6646**	11,9233**	38,0304**
T x Si	6	1,3668	0,2872	0,0354	9,7615
Erro b	18	3,7742	0,4136	0,0612	6,6988
Total	35				
Média Geral		31,93	4,50	4,58	16,95
CV <sub>1</sub> (%)		7,57	11,91	9,46	26,24
CV <sub>2</sub> (%)		6,08	14,30	5,40	15,27

(\*), (\*\*) Significativo aos níveis de probabilidade de 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

**TABELA 13A.** Resumo das análises de variância das variáveis TEMP, NH<sub>3</sub>, LEV e BAL das silagens de cana-de-açúcar após abertura dos silos

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio			
		TEMP	NH <sub>3</sub>	LEV	BAL
Silagem (Si)	2	202,9306**	0,6290	33,2653**	2,0172**
Erro a	6	3,9676	0,2251	0,0719	0,0799
Tempo (T)	3	193,1444**	28,5182**	78,0277**	0,8143**
T x Si	6	44,7083**	5,5486**	8,2698**	0,5781**
Erro b	18	2,1454	0,1055	0,0762	0,1222
Total	35				
Média Geral		26,22	10,48	6,70	9,65
CV <sub>1</sub> (%)		7,60	4,53	4,00	2,93
CV <sub>2</sub> (%)		5,59	3,10	4,12	2,62

(\*\*) Significativo ao nível de probabilidade de 1% pelo teste F.

**TABELA 14A.** Resumo das análises de variância das variáveis ácido acético e etanol das silagens de cana-de-açúcar após abertura dos silos

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio	
		acético	etanol
Silagem (Si)	2	5,9648	1,0785
Erro a	6	5,8443	0,2871
Tempo (T)	3	28,7806**	2,6646**
T x Si	6	1,3668	0,2872
Erro b	18	3,7742	0,4136
Total	35		
Média Geral		31,93	4,50
CV <sub>1</sub> (%)		7,57	11,91
CV <sub>2</sub> (%)		6,08	14,30

(\*\*) Significativo ao nível de probabilidade de 1% pelo teste F.

**TABELA 15A.** Composição química dos meios MRS, DRBC e YEPG utilizados para contagens de microrganismos.

Ingredientes	Quantidade (g/l de meio)		
	MRS	DRBC	YEPG
Peptona bacteriológica	10	5,0	
Peptona de soja			20
Extrato de carne	10		
Extrato de levedura	5		10
Glicose	20	10	20
Sorbetano monooleato (Tween 80)	1,0		
Fosfato de K dibásico	2,0	1,0	
Acetato de sódio-3H <sub>2</sub> O	5,0		
Citrato de amônio	2,0		
Sulfato de Mg-7 H <sub>2</sub> O	0,05	0,5	
Sulfato de Mn	0,05		
Rosa bengala		0,025	
Dicloran (0,2%)		0,2	
Cloranfenicol			
Ágar	16	15	16
pH	6,5		3,5