

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS,
MICROBIOLÓGICAS E QUÍMICAS DO CAPIM-MARANDU
(*Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A. Rich) Stapf cv.
Marandu) ENSILADO COM POLPA CÍTRICA PELETIZADA**

Thiago Fernandes Bernardes

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal –
Unesp, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia
– Área de concentração em Produção Animal

Jaboticabal - SP
Fevereiro - 2003

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THIAGO FERNANDES BERNARDES – Filho de Paulo Renato Bernardes e Marisa Celi Fernandes Bernardes, nasceu na cidade de Ibitiúva – SP em 24 de maio de 1977. Ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Lavras - UFLA, em agosto de 1995, onde foi bolsista de IC-CNPq no período de 1998 a 2000, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo em julho de 2000. Em março de 2001, ingressou no curso de Pós-graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, onde obteve o Título de Mestre em Fevereiro de 2003, quando iniciou o curso de Doutorado nesta mesma instituição.

“ O trabalho científico é lento na maioria das vezes, monótono e quase sempre sujeito às adversidades . Somente a disposição, a perseverança e o amor ao estudo e a pesquisa científica de interesse podem manter o pesquisador ligado ao seu trabalho. Não se devem esperar compensações financeiras ou gratidões humanas. O trabalho científico honesto é acompanhado sempre pela recompensa espiritual e, eventualmente, por alguma homenagem que florescerá de suas verdades”. **Petroianua**

À Deus

pela vida,
pela saúde,
pelo lar,
pelos amigos
pela coragem nos momentos difíceis
por iluminar meu caminho
e guiar meus passos na direção certa

Aos meus pais Paulo e Marisa

pelo amor
pela dedicação

À irmã Karina

pela força

À sobrinha Mônica

pelo sorriso

Ao cunhado Carlos Alberto

pelo amor ao campo

Aos avós

pelas orações

Aos tios e primos

pelo incentivo

À Livia

pelo amor e pela alegria de compartilhar a vida ao seu lado

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP/Jaboticabal) e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso;

Ao Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis pela orientação, competência e acima de tudo por ter acreditado no meu trabalho;

Ao Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken Iturrino pela confiança, estímulo e pelos valiosos ensinamentos em microbiologia;

À Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton pelo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa;

À companheira de Pós-graduação e amiga Andréia L. Moreira pelo auxílio prestado durante a execução do trabalho;

Ao companheiro de Pós-graduação e amigo Márcio S. Pedreira pelo contribuição e experiência;

À companheira de Pós-graduação e amiga Roselene N. da Silveira pela contribuição, colaboração e participação do preparo até o término deste trabalho;

Aos alunos da graduação e amigos Daniel S. Ferreira, Rafael C. do Amaral e Renata S. Parreira pelo auxílio durante a execução da pesquisa;

Aos alunos de Pós-graduação da Microbiologia Claudia J. Fialho, Fabiano Maeda e Thaís D. Gonçalves pela contribuição oferecida;

Aos companheiros de Pós-graduação e amigos Antônio R. da Silva (Toinho), Carlos Augusto Gomide, Cristiam Faturi, Djalma de Freitas, Edilane A. da Silva, Elizabete Furtado, Fábio L. Fregadoli, Flávia Simili, Gustavo R. Siqueira, Izabelle Molina, Maria Luiza Poiatti, Roberta C. Canesin, Rogério M. Coan, Severino G. Neto, Simone G. Oliveira e Zinaldo Firmino pelo companheirismo e pela contribuição direta ou indireta oferecida por cada um de vocês;

À funcionária do laboratório de Nutrição Animal Ana Paula Sader pelo convívio e auxílio nas análises laboratoriais;

Ao funcionário do laboratório de Forragicultura Alexandre Biondi pelo auxílio nas análises laboratoriais;

À funcionária do laboratório de Microbiologia Silvina Berchielli pela paciência e pelo apoio durante as análises;

À Universidade Federal de Lavras – UFLA pela formação acadêmica;

A cidade de Lavras e ao estado de Minas Gerais pela acolhida e pelo seu povo humilde e inspirador;

Aos eternos irmãos da República Mata-Burro e Fogo Paulista André (Pança), César (Zézinha), Eduardo (Piau), Fernando (Fefo), Guilherme (Ganso), Leandro (Jacobs), Leonardo (Buscapé), Martim (Denão) e Reginaldo (Gonçale) pelo momentos juntos vividos...;

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela auxílio financeiro que foram fundamentais para execução deste trabalho, proporcionando-me oportunidades nunca antes obtidas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS, MICROBIOLÓGICAS E QUÍMICAS DO CAPIM-MARANDU (*Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A. Rich) Stapf cv. Marandu) ENSILADO COM POLPA CÍTRICA PELETIZADA

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a composição química, o perfil fermentativo e microbiológico e as perdas envolvidas durante a ensilagem e após a abertura dos silos das silagens de capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A. Rich) Stapf cv. Marandu), conduziu-se três experimentos na FCAV/UNESP – Jaboticabal. No experimento 1 objetivou-se conhecer o perfil fermentativo, químico e microbiológico das silagens de capim-Marandu na presença de polpa cítrica peletizada (PCP). No experimento 2 o objetivo foi quantificar as perdas pela produção de efluente e analisar qual o potencial da PCP em reduzir a sua produção. O experimento 3, constou-se da caracterização da população microbiana e avaliação da estabilidade aeróbia das silagens de capim-Marandu na presença de PCP. No experimento 1 a presença de PCP aumentou os teores de CHOs, e apesar da baixa concentração de carboidratos nos tratamentos estudados proporcionaram silagens de qualidade satisfatória. O pH apresentou queda com o aumento das proporções do aditivo e estabilizou-se rapidamente a partir do quarto dia de ensilagem. Os teores de N-NH₃ (% N total) foram influenciados pela aplicação da PCP, porém, mesmo sem a sua presença, esses teores foram baixos, não prejudicando a qualidade da silagem. Quanto a composição química a utilização do aditivo aumentou os teores de PB, N-FDN, N-FDA e fração B3 e reduziu os teores dos constituintes da parede celular, aumentando os coeficientes de DIVMS. Com relação ao perfil microbiológico os resultados mostraram crescimento somente durante o primeiro dia de fermentação, devido a alta densidade e condições ácidas alcançadas. Houve pequeno desenvolvimento de clostrídeos e dominância das bactérias homofermentativas em relação as heterofermentativas. O uso do aditivo melhorou o perfil fermentativo, microbiológico e a composição química das silagens de

capim-Marandu. Apesar das silagens sem aditivo terem apresentado bom aspecto de conservação, seu uso é recomendado para prevenir perdas durante a ensilagem. Os resultados do experimento 2 mostraram que o alto conteúdo de umidade da forragem propiciou elevada quantidade de efluente, principalmente durante os dois primeiros dias de ensilagem. A presença da PCP reduziu de maneira significativa a produção de efluente, mostrando-se eficiente na redução das perdas por este caminho. As equações propostas por Sutter (1957) e Haigh (1999) baseadas no conteúdo de matéria seca da forragem, subestimaram a produção de efluente das silagens produzidas. Sendo que o efeito da alta compactação alcançada ficou evidenciado em relação as perdas ocasionadas durante a fermentação. No experimento 3 observou-se que as silagens de capim-Marandu com 0% de PCP apresentaram desenvolvimento de bacilos e enterobactérias, havendo também elevação dos teores de pH e N-NH₃ com o decorrer do desabastecimento dos silos. A presença de leveduras foi detectada nas silagens que receberam o aditivo, sendo que a população elevou-se do primeiro para o sexto dia de aeração. Os valores da PB, da fração B3 e da DIVMS foram reduzidos a medida que os tempos de aeração avançaram. Com o prolongamento da exposição aeróbia a tendência de elevação de temperatura foi detectada principalmente nas silagens com 10% de PCP. As estirpes de leveduras isoladas apresentaram assimilação positiva de lactato, caracterizando as silagens como sujeitas a rápida deterioração. Com a abertura dos silos, as silagens apresentaram-se instáveis seja pelo desenvolvimento de bactérias ou de leveduras reduzindo seu o valor nutritivo.

Fermentative, microbiological and chemical characteristics of Marandu-grass (*Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A. Rich) Stapf cv. Marandu) ensilaged with pelleted citrus pulp

ABSTRACT

With the goal to evaluate chemical composition, fermentative and microbiological profiles, and losses during ensilage process and after silos opening of Marandu-grass (*Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A. Rich) Stapf cv. Marandu) silages, three experiments were carried out at FCAV/UNESP – Jaboticabal. In experiment 1, the objective was to know the fermentative, chemical and microbiological profile of Marandu-grass silage plus pelleted citrus pulp (PCP). In experiment 2, the goal was to quantify the losses caused by effluent production and to analyze the PCP potential for its production reduction. In experiment 3, the microbial population was characterized and the aerobic steady was analyzed in Marandu-grass silage plus PCP. In experiment 1, PCP addition increased soluble carbohydrate levels and, instead of its low concentration in the studied treatments, PCP provided silages with satisfactory quality. The pH decreased with the increasing in additive proportion and stabilized quickly from fourth day of ensilage. N-NH₃ levels (% of total N) were affected by PCP, but when it was not added these levels were low too, and it did not prejudice the silage quality. In relation to chemical composition, the additive utilization increased CP, NDF-N, ADF-N and B3 fraction levels, and it reduced cellular wall components which increased DMIVD coefficients. Considering microbiological profile, results showed increase in enterobacteria population only at the first day of fermentation because of the high density and acid conditions. There was a small development of clostridium and dominance of homofermentative in relation to heterofermentative bacteria. Additive utilization improved chemical composition, fermentative and microbial profile of Marandu-grass silages. Instead of silages without additive had showed good conservation characteristics, its use is recommended for preventing losses during ensilage process. Results from experiment 2 showed that the high wet content in

forage caused a high amount of effluent, mainly during the first two days of ensilage. PCP reduced, significantly, the effluent production and was efficient for losses reduction. Sutter (1957) and Haigh (1999) equations, based in dry matter content of forage, underestimated the effluent production of produced silages, where the effect of the high compaction was bolded in relation to losses occurred during fermentation. In experiment 3, Marandu-grass silages without PCP showed bacillus and enterobacteria development and high values of pH and N-NH_3 when the exposition times increased. Yeast was detected in silages with additive, and the population increased from first to sixth day of aerial process. The CP, B3 fraction and DMIVD values reduced with increase of aerial times. With prolongation of aerobic exposition was detected a trend for temperature increase, mainly in silages with 10% of PCP. Isolated yeast stirps showed positive lactate assimilation that characterized silages as being prone to rapid deterioration. After silos opening, silages became unstable because of bacteria or yeast grown which reduced their nutritive value.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

O Brasil devido a sua vasta extensão territorial, associado ao clima tropical existente, destaca-se no contexto mundial como uma das grandes potências para a produção de carne bovina. Essa característica de clima ainda permite a existência de uma grande diversidade de plantas forrageiras, de elevado potencial de produção por área.

O potencial produtivo das gramíneas tropicais em sistemas intensivos podem alcançar valores próximos de 100-150 toneladas de matéria original por hectare por ano, mantendo em parte do período qualidade nutricional adequada, como é o caso da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu.

Apesar da grande disponibilidade das forrageiras tropicais utilizadas em pastejo, essas apresentam sua produção concentrada nos meses em que existe disponibilidade de temperatura e principalmente umidade (primavera e verão), caracterizando o fenômeno de estacionalidade de produção, no qual aproximadamente 80% desta ocorre na estação úmida, o que exige a adoção de técnicas que visem solucionar, ou pelo menos amenizar, os danos causados aos animais devido a falta de alimento nos períodos secos.

Neste contexto, a ensilagem de parte e/ou excesso de forragem oriundo do crescimento do período das águas dentro do sistema intensivo pode ser uma alternativa viável. Acredita-se que, com adoção desta estratégia, o pecuarista poderá garantir quantidades suficientes de alimento volumoso de boa qualidade para ser fornecido ao rebanho na época seca (Morais, 1999; Corrêa e Cordeiro, 2000; Reis e Coan, 2001).

A utilização de alimentos a base de silagem de milho, freqüentemente utilizado nos América do Norte e na Europa, tornam o custo de produção do período de escassez de alimentos muito elevado, tornando essa técnica muitas vezes inviável operacionalmente, devido a exigência de grandes extensões de terra, além de um

conhecimento aprofundado na cultura do milho, para se obter elevadas produtividades e viabilizar economicamente o sistema de produção.

Segundo Nussio et al. (2002a) dentre os aspectos que devem ser observados no planejamento da produção animal, o principal é a aptidão agrícola da região onde queira implantar o sistema produtivo, lembrando que a produção vegetal muitas vezes é negligenciada pelas características da região onde é implantada, como topografia, fertilidade do solo, clima, bem como a logística de produção. Assim, localidades onde a silagem de milho é a única opção como volumoso conservado, apresentam custos de produção elevados pela falta de qualificação da mão-de-obra e qualidade das práticas agronômicas dispensadas a cultura.

De posse desses conhecimentos, faz-se necessária à utilização de alimentos alternativos, com os quais o pecuarista estivesse mais adaptado. Nesse sentido, trabalhos estão sendo desenvolvidos buscando-se avaliar alimentos e técnicas de produção, como é o caso da ensilagem de capins tropicais.

Balsalobre et al. (2001) reportaram que o provável motivo do não uso de silagens de gramíneas tropicais, até recentemente, parece ter sido a falta de máquinas apropriadas para a tarefa de corte das plantas de alto potencial de produção. Porém, nos últimos quinze anos algumas empresas nacionais passaram a desenvolver e produzir equipamentos de maior capacidade operacional, o que tem viabilizado a adoção do uso de silagens em maior escala. Consequentemente, diversas propriedades passaram a adotar a ensilagem de capins tropicais como alternativa para suplementação volumosa dos animais no período seco do ano.

Entretanto, as gramíneas tropicais são plantas susceptíveis a perdas durante a ensilagem. Essas espécies apresentam altas taxas de crescimento, porém em virtude dos altos valores de perdas verificados nas diversas fases do processo, os expressivos patamares de produtividade da matéria seca nem sempre são traduzidos em forragem de boa qualidade disponível aos animais. A quantificação dessas perdas e a busca por técnicas que as minimizem, devem ser priorizadas em silagem de gramíneas (Balsalobre et al. 2001; Nussio et al., 2002b).

REVISÃO DE LITERATURA

A espécie *Brachiaria brizantha*

Gramínea perene originária na África, encontrada nas regiões tropicais, propagada por sementes, com hábito de crescimento cespitoso (Evangelista e Rocha, 1997). A espécie apresenta potencial de produção, vigor de rebrota e qualidade de forragem muito satisfatórios (Botrel et al., 1998) e boa relação folha/haste (Silva, 1995). São plantas que se adaptam a diversas regiões de solo e clima, sendo pouco tolerantes a temperaturas baixas.

Seu uso para formação de pastagens no Brasil é relativamente recente. No entanto, a expansão das áreas com esta espécie tem aumentado consideravelmente devido a uma série de características favoráveis, com destaque para boa tolerância às cigarrinha-das-pastagens (Botrel et al., 1998).

Segundo Zimmer e Euclides (2000), no Brasil tropical são semeados anualmente cerca de 5,5 milhões de hectares de pastagens perenes, incluindo formação, renovação ou recuperação, e que nos anos mais recentes predomina o interesse pela *Brachiaria brizantha* cv. Marandu que contempla mais de 50% do mercado de sementes das gramíneas forrageiras tropicais.

Áreas de pastagens formadas principalmente por *Brachiaria decumbens* e *B. brizantha* vem sendo, alternativamente, utilizadas para a produção de silagens, com produção semelhante ao gênero *Panicum*, e valor nutritivo ligeiramente superior (Nussio et al. 2000).

Balsalobre et al. (2001) relataram que a maior parte das gramíneas tropicais tem potencial para ensilagem, entretanto, plantas com maior proporção de folhas devem ser preferidas. Essas plantas, além de melhor qualidade, apresentam maiores teores de matéria seca, em especial o gênero *Brachiaria*, que se constituem em opção favorável a elevada relação folha/caule.

Polpa de citros

Capins tropicais apresentam baixos teores de carboidratos solúveis e alto teor de umidade. Portanto, para que se obtenha silagens de boa qualidade, com perdas reduzidas, as restrições quanto a umidade e carboidratos solúveis devem ser corrigidas pela adição de açúcares e incrementos no teor de matéria seca.

A polpa cítrica peletizada é um subproduto da agroindústria citrícola obtido após a extração do suco de laranja. É composto por cascas, sementes, bagaço e frutos cítricos descartados. Possui aproximadamente 88% de matéria seca, 7 % de proteína bruta, 22% de fibra em detergente neutro, 26% de açúcares, 1% de amido e 33% de fibra solúvel em detergente neutro (Hall, 2001).

Pelo fato de apresentar alto teor de MS e de carboidratos solúveis, a polpa de citros vem sendo amplamente utilizada como aditivo no momento da ensilagem. De acordo com os trabalhos revisados (Evangelista et al., 1996; Aguiar et al., 2000; Lima et al., 2000; Pedreira et al., 2001; Silva, 2002), a adição de polpa melhorou o padrão de fermentação das silagens, reduzindo os valores de pH (próximos a 3,8) e nitrogênio amoniacal (abaixo de 15%).

Além de possuir alto teor de carboidratos solúveis, a polpa cítrica apresenta em sua composição um carboidrato complexo de grande valia na alimentação de ruminantes. A pectina é um polissacarídeo rico em ácido galacturônico que ocorre na lamela média e outras camadas da parede celular. Do ponto de vista nutricional, as “pectinas” de interesse são as substâncias pécticas, constituídas por uma espinha dorsal de ácido urônico e também cadeias laterais de açúcares, predominantemente de arabinose e arabinose + galactose (Van Soest, 1994).

Entre forragens, as gramíneas tem baixas concentrações de pectina (2-5%), enquanto que as leguminosas possuem maiores valores (6-14%), com base na matéria seca. Além da polpa cítrica, outros subprodutos alimentares são ricos em pectina tais como polpa de beterraba (25%) e resíduo de maçã seco (10%). A casca de soja também contém pectina, e seus valores estão próximos a 17% (Hall, 2001).

A polpa cítrica é muito absorvente, chegando a elevar seu peso em 145% quando em contato com forragens úmidas. Desse modo, preserva nutrientes que, caso contrário, seriam perdidos pelo efluente ou pela própria fermentação descontrolada durante o armazenamento (Vilela, 1998).

Segundo Woolford (1984) o volume de efluente produzido, durante a ensilagem, é inversamente proporcional ao conteúdo de matéria seca do material ensilado, embora o grau de compactação e condição da forragem sejam outros fatores controladores importantes da produção de efluente.

Aguiar et al. (2000) com o objetivo de verificar a produção de efluente e a perda por gases na silagem com três tamanhos de partícula e em três quantidades de polpa cítrica como aditivo (5, 10 e 15%) nas silagens de capim-Tanzânia (60 dias de rebrota), observaram que a adição deste aditivo reduziu as perdas por efluente, assim como as perdas totais, enquanto as perdas por gases foram reduzidas à partir de 4,25% de adição de polpa cítrica. Da mesma forma, Igarasi (2002) estudou a produção de efluente nas silagens de capim-Tanzânia ensilado com dois tamanhos de partícula, adicionadas de polpa cítrica peletizada, pré-secadas e inoculadas, em duas épocas do ano (verão e inverno), e observou que a presença de polpa cítrica peletizada corrigiu os teores de matéria seca e proporcionou a diminuição de perdas por líquido lixiviado.

Estabilidade em aerobiose

Quando as silagens são expostas ao ar, microrganismos oportunistas iniciam atividade metabólica, produzindo calor e consumindo nutrientes, resultando em perdas no valor nutritivo do alimento (Kung Jr., 2001). A resistência ao aumento da temperatura da silagem no painel do silo e durante a oferta aos animais no cocho tem sido denominada por vários pesquisadores europeus e norte americanos como estabilidade aeróbia. O' Kiely et al. (1999) caracterizaram estabilidade aeróbia como sendo o tempo observado para que a massa de silagem, após a abertura do silo, apresente elevação em 2 °C em relação a temperatura ambiente (20 °C), acumulada até o 5º dia pós-abertura. Ruppel et al. (1995) sugere outra

metodologia, na qual menciona que estabilidade aeróbia pode ser caracterizada como uma taxa de elevação de temperatura. Usando o máximo da temperatura observada (°C) dividida pelo tempo necessário (h) para alcançar a máxima temperatura.

Driehuis et al. (2001) realizando experimentos com a inoculação de cepas de bactérias ácido-láticas homofermentativas (*Lactobacillus plantarum*) e heterofermentativas (*L. buchneri*) definiram estabilidade como sendo o tempo necessário para que a massa de silagem, atinja 1 °C acima da temperatura de referência (20 °C). Muck e Kung Jr. (1997) discutem sobre a estabilidade aeróbia das silagens aditivadas com inoculantes bacterianos, destacando que a instabilidade é afetada pelo pH e pelo ácido predominante produzido durante a fermentação da silagem. O pH mais baixo produzido por um inoculante deveria melhorar a vida útil da silagem, no entanto a maior concentração de ácido láctico, predominante em silagens decorrentes da fermentação desejável, parece ser menos inibitório que o ácido acético as leveduras e fungos filamentosos, causadores do aquecimento e perdas.

Em pesquisas realizadas no Brasil, Guim (1997) trabalhando com capim-Elefante inoculado com bactérias homofermentadores avaliou a estabilidade pela produção de CO₂ e contagem total de leveduras, fungos filamentosos e lactobacilos. Jobim (1998) estudando a instabilidade de silagens de grãos úmidos de milho utilizou a contagem total de leveduras, fungos filamentosos e enterobactérias para caracterizar o processo de deterioração da silagem.

Microbiologia da silagem

Segundo McDonald et al. (1991) o primeiro objetivo do processo de ensilagem é preservar a cultura pela fermentação natural em condições anaeróbias. O segundo é inibir a atividade de microrganismos indesejáveis como os clostrídeos e as enterobactérias, devido a sua capacidade de deteriorar a matéria orgânica.

Os clostrídeos estão geralmente presentes nas folhas colhidas, na forma de esporos, mas iniciam sua multiplicação tão logo as condições no silo tornem-se

anaeróbias. O crescimento destes microrganismos é indesejável, pois produzem o ácido butírico e degradam os aminoácidos que depreciam o valor nutritivo da silagem (Pitt, 1990).

As enterobactérias não tem esporos, são anaeróbias facultativas e fermentam os açúcares a ácido acético e outros produtos, e também degradam aminoácidos. O caminho mais comum de inibição destes microrganismos é promovendo a anaerobiose e a fermentação que leva a produção de ácido láctico (Ostling e Lindgren, 1995).

As bactérias formadoras de ácido láctico estão normalmente presentes na forragem, do mesmo modo que as enterobactérias. Esses microrganismos fermentam os açúcares de ocorrência natural na cultura (principalmente glicose e frutose), produzindo uma mistura de ácidos, predominantemente o ácido láctico (Jaster, 1995).

A presença de levedura é inevitável no processo fermentativo como uma forma de microrganismo causador de perdas por deterioração, especialmente quando há presença de oxigênio, durante as primeiras horas de ensilagem e após a abertura do silo (Woolford, 1984).

Segundo McDonald et al. (1991) bactérias do gênero bacilos contribuem pouco ou quase nada na preservação de silagem, desempenhando grande importância no processo de deterioração aeróbia, sob condições de pH acima 5,0 e temperatura alta.

Depois da ensilagem alguns microrganismos são capazes de crescer em ambiente anaeróbio (bactérias ácido-láticas, enterobactérias, clostrídeos e bacilos) e começam a competir por nutrientes. As mudanças nos primeiros dias são críticas para o sucesso ou fracasso da silagem. Se as condições forem favoráveis, as bactérias ácido-láticas acidificam rapidamente o ambiente inibindo o desenvolvimento dos seus competidores e resultando num ambiente estável de baixo pH. Se o pH não diminuir rapidamente os microrganismos indesejáveis são capazes de competir por nutrientes, reduzindo as chances mesmo futuras de obter

silagem estável, já que muito dos seus produtos não participam do processo de fermentação (Jaster, 1995).

Bactérias ácido-láticas

As bactérias ácido-láticas existem naturalmente na cultura, contudo não se sabe ao certo qual sua função na planta viva. Talvez elas atuem como protetoras contra patógenos pela produção de ácidos antagônicos ou agentes antifúngicos. Uma evidência desse fato é que um maior número de bactérias são encontradas em plantas danificadas (McDonald et al., 1991).

Esta denominação descreve um grupo de bactérias com habilidade para produzir ácido láctico. Originalmente o nome foi designado ao grupo de bactérias responsáveis pela acidificação do leite e de produtos lácticos. São classificadas como gram-positivas, microaerófila, não esporulada, usualmente não móveis, as quais fermentam principalmente os açúcares a ácido láctico, e com base no seu metabolismo fermentativo foram posteriormente divididas em homofermentativas e heterofermentativas (McDonald et al., 1991).

Os gêneros *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* são as bactérias que constituem o principal grupo de microrganismos que atua durante o processo fermentativo para a conservação da massa ensilada.

Segundo McDonald et al., (1991) os estreptococos estão divididos em três grupos geneticamente distintos: a) Estreptococos *sensu stricto*, que compreende a maioria dos estreptococos; b) Enterococos formados por enterococos típicos (*Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*) e c) Lactococos que contêm todos os estreptococos lácticos (*Streptococcus lactis*).

No grupo dos *Lactobacillus* encontram-se espécies homo e heterofermentativas, sendo *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* homofermentativas e *Leuconostoc* heterofermentativas (Woolford, 1984).

Segundo McDonald et al. (1991) sob condições anaeróbias, as bactérias ácido-láticas podem fermentar uma larga amplitude de substratos usando

diferentes rotas metabólicas. A via seguida por fermentação de hexoses de açúcares é usada como a base de sua identificação.

As bactérias ácido-láticas são divididas em três grupos fisiologicamente distintos: a) **Homofermentadores obrigatórios**, que são aqueles que fermentam hexoses quase que exclusivamente a ácido láctico, mas pentoses não são fermentados. Estas bactérias contêm frutose bifosfato aldolase (FBA), mas não possuem fosfoquetolase; b) **Heterofermentadores facultativos**, que são aqueles que possuem FBA e também fermentam hexoses quase que exclusivamente a ácido láctico, mas elas são capazes de fermentar pentoses a ácido láctico e ácido acético usando fosfoquetolase induzida e c) **Heterofermentadores obrigatórios**, fermentam hexoses a ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂, e possuem fosfoquetolase, mas não possuem FBA (McDonald et al., 1991).

Streptococcus e *Lactobacillus* são bactérias ácido-láticas homofermentativas, utilizam a via glicolítica para o metabolismo do açúcar e em condições de baixa tensão de oxigênio tem como produto principal o ácido láctico. Porém, muitas dessas bactérias possuem a capacidade genética para formar outros produtos a partir do piruvato, como o acetato, o etanol e o CO₂. A formação desses compostos pode ser verificada em condições de baixa disponibilidade de glicose e é atribuída as baixas concentrações de frutose 1-6 bifosfato, um ativador essencial da lactato desidrogenase. Sob tais condições, a homofermentação efetivamente se torna heterofermentação, tendo como principais produtos o etanol, o ácido acético, o manitol e o ácido fórmico (McDonald et al., 1991).

A proporção e dominância entre as diferentes espécies de bactérias dependerá do substrato e do comportamento de queda do pH. Uma característica marcante de bactérias ácido-láticas é sua alta tolerância a pH baixo. Uma amplitude de pH em que ocorre crescimento é ao redor de 4,0 a 6,8, embora algumas espécies de *Pediococcus* cresçam em pH 3,5. *Enterococcus* associados com silagem (*E. faecalis* e *E. faecium*) são capazes de iniciar seu crescimento em pH 9,6 e reduzem seu crescimento em pH 4,0. *Lactobacillus* crescem melhor em

meio ácido com pH inicial de 6,4 a 4,5, e geralmente decresce em pH menor que 4,0 (Woolford, 1984).

A amplitude de temperatura é muito variável, existindo crescimento numa faixa de 5 a 50°C, sendo considerado ótimo ao redor de 30°C. A maioria das espécies de *Lactobacillus* e *Enterococcus* crescem a 15°C, mas não mais que 45°C (Woolford, 1984).

Enterobactérias

Este grupo de microrganismos desperta muito interesse pelo fato de algumas espécies serem patogênicas ao homem, plantas e animais. São definidas como gram-negativas, não esporuladas, anaeróbias facultativas, normalmente móveis e fermentadoras de carboidrato (McDonald et al., 1991).

Pouco presentes nas gramíneas, esses microrganismos são ativos nos estágios iniciais de ensilagem e produzem grande quantidade de acetato. A baixa disponibilidade de oxigênio provocada pelo consumo deste elemento durante as primeiras horas de ensilagem e o desenvolvimento de bactérias ácido-láticas, com subsequente queda no pH, levam a um decréscimo no seu número, porém podem persistir se as condições de anaerobiose não forem alcançadas e se a fermentação láctica for atrasada, podendo também aumentar durante a deterioração aeróbia (Woolford, 1984).

Sua presença é indesejável, pois consomem nutrientes que estariam disponíveis as bactérias ácido-láticas, além de produzirem toxinas e grande quantidade de amônia, durante a ensilagem. Os produtos da fermentação são o lactato, o acetato, o succinato e o etanol (Henderson, 1993).

Segundo Ostling e Lindgren (1995) as principais espécies são *Erwinia herbicola* e *Rahnella aquitilis*, predominantes em gramíneas frescas, mas após a ensilagem elas são dominadas por *Hafnia alvei* e, finalmente por *Escherichia coli* e *Serratia fonticola*, que ocorrem no início da fermentação se o pH diminui rapidamente.

Altos níveis de adubação nitrogenada têm efeito detrimental no potencial da cultura para a ensilagem, pois diminuem a concentração de carboidratos solúveis, aumentam a concentração de proteína e a capacidade de tamponamento. Sob estas condições, a queda do pH é lenta e o maior pH final permite que as enterobactérias persistam na silagem. Embora possuam fraca atividade proteolítica, podem deaminar e descarboxilar alguns aminoácidos, formando amônia durante a ensilagem (McDonald et al., 1991; Henderson, 1993).

A produção de nitrato começa poucas horas após a ensilagem e os produtos finais da redução são os gases: óxido nítrico (NO) e o óxido nitroso (N₂O), prejudiciais às pessoas que trabalham durante o enchimento ou esvaziamento dos silos, causando desde problemas respiratórios até a morte. A extensão da redução do nitrato depende da taxa de acidificação da silagem, sendo que isto ocorre em silagens de qualidade inferior (McDonald et al., 1991).

Clostrídeos

São bactérias gram-positivas, esporulantes, normalmente móveis, estritamente anaeróbios, fermentam os açúcares, os ácidos orgânicos ou as proteínas (Collins e Lyne, 1989). Esses microrganismos desenvolvem-se em pequenos nichos criados por microrganismos aeróbios, como as leveduras e os bacilos, que usam o ácido láctico e os aminoácidos, reduzindo o oxigênio e aumentando o pH, tornando-as ideais para o crescimento dos clostrídeos (Pitt, 1990; McDonald et al., 1991).

Além de sua ocorrência em silagens, os clostrídeos podem desenvolver-se em fezes e no solo. A sua presença na silagem é resultado de contaminação de solo, já que o número desses microrganismos nas plantas verdes é geralmente baixo (Woolford, 1984).

Segundo McDonald et al. (1991) depois do fechamento do silo, certos clostrídeos multiplicam-se quase que tão precocemente quanto outras bactérias que ocorrem nos primeiros dias. O fluido celular de plantas é um meio ideal para seu crescimento e se a silagem for adequadamente consolidada e o silo

efetivamente fechado, a condição anaeróbia é rapidamente atingida. Apesar disso, o crescimento extensivo de clostrídeos normalmente ocorre somente em estágios tardios de ensilagem e seus produtos metabólicos tendem a aparecer em silagens mais velhas.

O crescimento de clostrídeos é estimulado pela alta temperatura de estocagem, baixo teor de matéria seca, baixo teor de carboidratos solúveis e alta capacidade de tamponamento. Se um pH baixo e estável não é atingido, a atividade clostridiana será encorajada, ocorrendo fermentação secundária (Pitt, 1990).

São divididos em dois grandes grupos: **a) Clostrídeos sacarolíticos** (*Clostridium butyricum*), que fermentam principalmente açúcares (glicose e frutose) e ácidos orgânicos, com pouca atividade contra proteínas e aminoácidos; **b) Clostrídeos proteolíticos** (*Clostridium sporogenes*), que fermentam principalmente aminoácidos. Alguns clostrídeos como *Clostridium perfringens* tem os dois tipos de atividade (McDonald et al., 1991)

Os aminoácidos são fermentados por três vias principais: via deaminação (aminoácidos alifáticos), descarboxilação (aminoácidos aromáticos) e reações de oxi-redução. A deaminação causa produção de aminas, a descarboxilação causa liberação de CO₂ e produz aminas, e as reações de oxi-redução produzem ácidos graxos e CO₂. Nas reações de deaminação e oxi-redução a amônia é liberada, podendo-se utilizar sua concentração na silagem como um indicador do grau de atividade proteolítica de clostrídeos, pois este composto não pode ser produzido por outros microrganismos ou enzimas vegetais, embora tenha sido descoberto que enterobactérias também produzem-na (McGeachan, 1989; McDonald et al., 1991).

Nussio et al. (2002b) relataram que as perdas de um alimento ensilado podem ser quantificadas através do desaparecimento de matéria seca ou energia durante o processo de ensilagem. Segundo Kung Jr. (2001) a fermentação por bactérias ácido-láticas deve ser desejável devido a elevada recuperação de energia e matéria seca. Pois, na fermentação indesejável, provocada por clostrídeos,

grandes quantidades de dióxido de carbono (CO₂) são produzidas e pelo fato de ser um gás, o carbono (ou matéria seca) é perdido para o meio ambiente. Isso explica porque essas fermentações tem baixa recuperação de matéria seca.

Além das perdas de matéria seca e de energia, a atuação dos clostrídeos sobre a silagem reduz a ingestão pelos animais em razão da presença de produtos oriundos do processo fermentativo como a amônia, o ácido butírico e algumas poliaminas.

A fermentação por clostrídeos caracteriza-se por alto teor de nitrogênio solúvel em água, alta concentração de nitrogênio volátil, alto teor de ácido butírico e baixa concentração de ácido láctico (Pitt, 1990). A recente revisão de Charmley (2001) relatou que o ácido acético, o ácido butírico e a amônia podem ter efeito negativo sobre a aceitabilidade e ingestão, e que as frações nitrogenadas solúveis (aminas, peptídeos, aminoácidos e amônia), decorrentes de proteólise e deaminação, causam desequilíbrio na relação proteína: energia das silagens, implicando em baixa contribuição para manutenção e crescimento dos microrganismos ruminais.

Bacilos

São bactérias em forma de bastonetes, gram-positivos, esporulados, normalmente móveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos e fermentam principalmente as proteínas. Muitas espécies estão presentes normalmente no solo e nos vegetais em decomposição. Alguns causam enfermidades no homem e nos animais, outros estão relacionados com alteração nos alimentos (Collins e Lyne, 1989).

Inicialmente, acreditava-se que os bacilos exerciam função secundária aquela das leveduras na deterioração de silagens. Porém, extensos estudos revelaram que esses microrganismos exercem uma função muito mais importante do que se acreditava (Woolford, 1990).

Segundo McDonald et al. (1991) a proteólise e parte da aminogênese são causadas por enzimas de plantas, porém a degradação de aminoácidos ocorre principalmente por ação dos clostrídeos e bacilos.

Woolford (1990) relatou que as bactérias, particularmente aquelas com propriedades proteolíticas, estão implicadas nas fases finais de deterioração. No entanto, Lindgren et al. (1985) observaram que para silagens com boa estabilidade durante a armazenagem, a deterioração inicial pode ser causada por bactérias. As principais espécies implicadas na deterioração são *Bacillus cereus*, *B. firmus*, *B. lentus* e *B. sphaericus*.

Fungos

São organismos pertencentes ao reino Fungi, aclorofilados e eucarióticos. Não formam tecidos especializados e sistemas de órgãos como as plantas e animais superiores. E são classificados de acordo com as estruturas de reprodução (Guarro et al., 1999)

Fungos são microrganismos que crescem como células únicas (leveduras) ou colônias filamentosas multicelulares (mofos). Obtém nutrientes para seu crescimento secretando enzimas extracelulares (proteases, amilases, celulasas, lipases) quebrando moléculas orgânicas complexas a monômeros simples, absorvendo-os pela membrana celular. Quando acaba o alimento no local de ação, os fungos rapidamente disseminam suas estruturas de reprodução, que são muitas vezes resistentes as condições adversas e ao tempo, colonizando novas áreas e se alastrando em condições propícias, velozmente sobre o substrato (Guarro et al., 1999).

McDonald et al. (1991) relataram que a maioria é estritamente aeróbio necessitando de oxigênio para crescer, embora algumas leveduras e poucos fungos filamentosos possam crescer sob condições anaeróbias, obtendo energia pela fermentação. Segundo Woolford (1990) os fungos tem crescimento mais lento que as leveduras, e normalmente apresentam menor população durante a armazenagem devido a maior sensibilidade a falta de oxigênio.

Fungos filamentosos

Apesar de não serem importantes durante a fermentação da silagem, os fungos filamentosos contribuem para as perdas na superfície do silo durante o descarregamento e em casos de vedação inadequada.

De acordo com Seglar (1997) as condições que mais favorecem o crescimento de fungos, no campo ou no silo são: a) umidade acima de 13%, b) umidade relativa acima de 70%; c) temperatura alta; d) nutrientes prontamente disponíveis; e) pH acima de 5,0 e f) presença de oxigênio. Segundo Woolford (1990) a concepção da insignificância dos fungos na fermentação está baseada na premissa de que todos os fungos filamentosos são aeróbios. No entanto, segundo o autor, das 49 espécies isoladas em silagens de gramíneas 22 são capazes de crescerem numa atmosfera contendo 10% de CO₂. Assim, muitos fungos podem sobreviver em meio ácido, persistindo durante a ensilagem, desempenhando uma função até agora desconhecida. Ainda, segundo o autor, a questão é saber qual o grau de anaerobiose conseguido na ensilagem em condições práticas. É possível que em algumas silagens as condições microaeróbias prevaleçam, especialmente próxima à superfície, favorecendo o crescimento do microrganismo.

Os fungos presentes na deterioração da silagem são representados por muitos gêneros, incluindo os tipos termofílicos. Em algumas silagens, o crescimento dos fungos segue os das leveduras e isso freqüentemente é refletido no aparecimento de dois picos de elevação da temperatura durante a deterioração. O primeiro pico pode ocorrer dentro de dois a três dias de exposição ao ar, que é atribuído as leveduras e o segundo, ocorrendo de três a quatro dias após o primeiro, podendo ser atribuído aos fungos filamentosos. Um grande número de espécies tem sido isoladas de silagens deterioradas incluindo membros do gênero *Monascus*, *Geotrichum*, *Bissochlamys*, *Mucor*, *Monilia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (McDonald et al, 1991).

Segundo Seglar (1997) a cor dos fungos é um pobre indicador de sua identidade, apesar dos fungos cinza/pretos (*Monilia*, *Rhizopus* e *Mucor*) serem

considerados geralmente menos problemáticos do que os brancos/róseos (*Fusarium*), amarelo/verde (*Aspergillus*) ou azul/verde (*Penicillium*).

A presença de fungos na silagem é indesejável, não somente pelo uso de açúcares e do ácido láctico, via rota respiratória, mas também pela produção de micotoxinas. As micotoxinas são produzidas por fungos durante a formação dos esporos para propagação das espécies, quando há produção de alguns compostos bioquímicos de baixo peso molecular, alguns dos quais são tóxicos aos animais (McDonald et al., 1991).

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são considerados os mais importantes na produção de micotoxinas prejudiciais a bovinos (Whitlow e Hagler Jr., 1997). Muitos fungos comuns às silagens não produzem nenhuma toxina conhecida. Segundo Woolford (1990) a formação de micotoxinas na forragem é determinada por uma série de fatores como estágio de desenvolvimento da cultura, tipo de solo, presença de oxigênio e atividades sinérgicas ou antagônicas entre as espécies de fungos. Portanto, a presença de esporos de fungos capazes de elaborar toxinas não é uma garantia de que essas estarão presentes na silagem.

Whitlow e Hagler Jr. (1997) relataram que o estudo das micotoxinas está num estágio inicial de desenvolvimento, pois os dados para bovinos são muito limitados e a maioria é baseada em estudos de casos isolados ou controlados com uso de altas doses e poucos animais. O efeito das micotoxinas em ruminantes parece ser menos severo do que para monogástricos, provavelmente devido a uma parcial degradação das micotoxinas no rúmen.

Leveduras

As leveduras são fungos que crescem como células únicas, apresentando característica comum ao reino, como seres eucarióticos, pertencem as divisões Ascomycota e Basidiomycota com reprodução vegetativa e sexuada (Guarro et al., 1999).

Apesar de serem capazes de fermentar açúcares e produzir o lactato e o acetato, sua presença na silagem não é desejável, pois primeiramente estão associadas com deterioração, e em segundo lugar competem com as bactérias ácido-láticas por substrato, que fermentam principalmente a etanol, contribuindo pouco para a preservação da silagem (Woolford, 1990).

Woolford (1990) reportou que as leveduras capazes de fermentarem açúcares além de glicose (*Saccharomyces*), parecem tolerar efeitos adversos do baixo pH e anaerobiose melhor do que aquelas capazes de fermentar somente a glicose, pois tem fonte extra de energia.

No contexto da silagem, seu maior papel é deteriorar o alimento quando exposta ao ar. A maioria encontrada em forragem fresca é constituída de espécies não fermentativas como os gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Candida* e *Hansenula*. A contagem de leveduras pode aumentar durante a secagem do material devido as condições favoráveis para crescimento e contaminação com o solo. Após estabelecer um ambiente anaeróbio no silo, as espécies aeróbias são sucedidas pelas leveduras fermentativas, cujas principais espécies são: *Torulopsis* e *Saccharomyces*. Caso haja entrada de ar no silo durante a fermentação, as leveduras fermentadoras de lactato dominam, mas se prevalecer as condições anaeróbias estas espécies serão reduzidas a 15% do total e permanecerão as *Saccharomyces*, que embora fermentativas não usam o lactato (Woolford, 1990).

As leveduras não são inibidas pelo pH das silagens, podendo ser encontradas com valores variando de 3,0 a 8,0. Sob condições aeróbias são capazes de tolerar ácidos orgânicos melhor do que qualquer microrganismo, obtendo energia pela fermentação de açúcares (McDonald et al., 1991).

No entanto, segundo Lindgren et al. (1985) há pouca informação disponível sobre o potencial de sobrevivência das leveduras em silagens com alto teor de ácido láctico, sob condições anaeróbias.

A maioria das leveduras crescem entre 0 a 37 °C, mas somente algumas podem crescer acima de 45 °C. São estimuladas pelo alto teor de matéria seca da silagem, diferente dos fungos filamentosos, embora requeiram uma superfície

úmida para crescerem. Encontradas mais freqüentemente em silagem de milho, silagem com alto teor de açúcares residuais e em silagens pré-secadas cuja a fase aeróbia inicial no silo é prolongada (McDonald et al., 1991).

OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos desse estudo foram os de determinar como o uso da polpa cítrica peletizada, na ensilagem, alteraria as características de fermentação, a composição química, o perfil microbiológico e a estabilidade aeróbia na silagem do capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu), visando oferecer contribuições para o conhecimento do processo de ensilagem de gramíneas tropicais, bem como as perdas associadas ao processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R. N. S., CRESTANA, R. F., BALSALOBRE, M. A. A., et al. Avaliação das perdas de matéria seca em silagem de capim-Tanzânia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa:SBZ, 2000. CD ROM.

BALSALOBRE, M. A. A., NUSSIO, L. G., MARTHA Jr., G. B. Controle de perdas na produção de silagens de gramíneas tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:SBZ, 2001, p. 890-911.

BOTREL, M. de A., NOVAES, L. P. N., ALVIM, M. J. **Características forrageiras de algumas gramíneas tropicais**. Juiz de Fora:EMBRAPA-CNPGL, 1998. 35p. (EMBRAPA-CNPGL. Documentos,66).

CHARMLEY, E. Towards improved silage quality – A review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 81, p. 157-168, 2001.

COLLINS, C. H., LYNE, P. M. **Microbiological methods**. Butterworths & (Publishers), London. 1989, 524p.

CORRÊA, L. A., CORDEIRO, C. A. **Silagem de capim como estratégia de manejo intensivo de pastagens**. São Carlos:EMBRAPA-CPPSE. 2000. 6p. (EMBRAPA-CPPSE. Comunicado técnico, 26).

DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, W. H., VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculant with *Lactobacillus buchneri*, with or without mofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v. 56, p. 330-343, 2001.

EVANGELISTA, A. R., ROCHA, G. P. **Forragicultura**. Lavras:UFLA/FAEPE, 1997. 246p.

EVANGELISTA, A. R., SILVA, L. V., CORREIA, L. F. A., et al. Efeito de diferentes níveis de polpa cítrica, como aditivo, na silagem de capim-Napier (*Pennisetum purpureum* Schum. Cv. Napier). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 33, 1996. Fortaleza. **Anais...** Fortaleza:SBZ, 1996, p. 354-355.

GUARRO, J., GENÉ, J., STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 454-489, 1999.

GUIM, A. Estabilidade aeróbia de silagens de capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) emurhecido e tratado com inoculante microbiano. Tese de Doutorado - UNESP/Jaboticabal, 1997, 86p.

HALL, M B. Recent advanced in non-ndf carbohydrates for the nutrition of lactating cows, In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOS DE LEITE. 2, 2001, Lavras. **Anais...** Lavras:UFLA-FAEPE, 2001, p.139-148.

HENDERSON, N. Additives silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 33, p. 35-56, 1993.

IGARASI, M. S. Controle de perdas na ensilagem de capim-Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. Cv. Tanzânia) sob os efeitos do teor de matéria seca, do tamanho de partícula, da estação do ano e da presença do inoculante bacteriano. Dissertação de Mestrado -ESALQ/USP, 2002, 132p.

JASTER, E. H. Legume and grass silage preservation. In: **Post harvest physiology and preservation of forages**. CSSA, n. 22, ASAS, CSSA, 1995, p. 91-115.

JOBIM, C. C. Avaliação das características microbiológicas, químicas e digestibilidade das silagens de grãos úmidos e de espigas de milho. Tese de Doutorado - UNESP/Jaboticabal, 1996, 98p.

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

LIMA, J. A., EVANGELISTA, A. R., SILVA, C. L., et al. Efeito de aditivos na silagem de coastcross (*Cynodon dactylon* L.) colhido com cinco semanas de idade. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa:SBZ, 2000. CD ROM.

LIDGREN, S. PETTERSSON, K., KASPERSON, A., et al. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. **Journal Science Food Agriculture**, v. 36, p. 765-774, 1985.

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

McGECHAN, M. B. A review of losses arising during conservation of grass forage: Storage losses. **Journal Agricultural Engineering Research**, v. 45, p. 1-30, 1989.

MORAIS, J. P. G. de. Silagem de gramíneas tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS. 7., 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:FEALQ, 1999. p. 89-95.

MUCK, R. E., KUNG Jr., L. Effects of silage additives on ensiling. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK. NRAES-99, Herchey, 1997. **Proceedings...** Herchey:NRAES, 1997, p. 187-1999.

NUSSIO, L. G., MANZANO, R. P., AGUIAR, R. N., Silagem do excedente de produção das pastagens para suplementação na seca. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DO GADO DE CORTE. 1, 2000, Goiânia. **Anais...** Goiânia:CBNA, 2000, p.121-138.

NUSSIO, L. G., CAMPOS, F. P., PAZIANI, S. de F., SANTOS, F. A. P. Volumosos suplementares – estratégia de decisão e utilização. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS. 3, 2002, Lavras. **Anais...** Lavras:UFLA, 2002a, p. 193-232.

NUSSIO, L. G., PAZIANI, S. F., NUSSIO, C. M. B. Ensilagem de capins tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39. 2002. Recife. **Anais...** Recife:SBZ, 2002b, p. 60-99.

O'Kiely, P., Moloney, A. Keating, T., Shiels, P. Sulphites to improve aerobic stability. In: Maximizing output of beef within cost efficient, environmentally compatible forage conservation systems. Grange Resarch Centre, TEAGASC, Dunsany, Co. Meath, Ireland, 1999, p. 31-33.

OSTLING, C., LINDGREN, S. Influences of enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silages. **Grass and Forage Science.**, v. 50, p. 41-47, 1995.

PEDREIRA, M. S., MOREIRA, A. L., REIS, R. A., et al. Características químicas e fermentativas do Tifton 85 (*Cynodon* spp.) ensilado com diferentes conteúdos de matéria seca e níveis de polpa cítrica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:SBZ, 2001. CD ROM.

PITT, R. E. **Silage and hay preservation.** Ithaca:Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1990. 53p. (NRAES-5).

REIS, R. A., COAN, R. M. Produção e utilização de silagens de gramíneas. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS. **Anais...** Goiânia:CBNA, 2001, p. 91-120.

RUPPEL, K. A., PITT, R. E., CHASE, L. E., GALTON, D. M. Bunker silo management and its relationship to forage preservation on dairy farms. **Journal of Dairy Science**. v. 78, p. 141-153, 1995.

SEGLAR, B. Case studies that implicate silage mycotoxins as the cause of dairy herd problems. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK, Ithaca, 1997. **Proceedings**. Ithaca:NRAES, 1997. p. 242-254.

SILVA, C. L. Perfil de fermentação das silagens de capim-Tanzânia com aditivos. Dissertação de mestrado – UFLA, 2002, 83p.

SILVA, S. C. Manejo de plantas forrageiras dos gêneros *Brachiaria*, *Cynodon* e *Setaria*. In: VOLUMOSOS PARA BOVINOS. 2 ed. 1995, Piracicaba:FEALQ, 1995. p. 29-57.

VAN SOEST, P. **Nutritional ecology of the ruminant**. New York, 1994. 476p.

VILELA, D. Aditivos para silagens de plantas de clima tropical. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES E NÃO-RUMINANTES, Botucatu, 1998. **Anais**. Botucatu:SBZ, 1998. P. 73-108.

ZIMMER, A. H., EUCLIDES, V. P. B. Importância das pastagens para o futuro da pecuária de corte no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS. 1., 2000, Lavras. **Anais...** Lavras:UFLA, 2000, p. 1-50.

WHITLOW, L. W., HAGLER Jr., W. N. Effects of mycotoxins on the animal: The producer's perspective. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK, Ithaca, 1997. **Proceedings**. Ithaca:NRAES, 1997. p. 222-232.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York, 1984. 305p.
WOOLFORD, M. K. The detrimental effects of air on silage. **Journal Applied Bacteriology**., v. 68, p. 101-116, 1990.

CAPÍTULO 2 – PERFIL FERMENTATIVO, QUÍMICO E MICROBIOLÓGICO DO CAPIM-MARANDU ENSILADO COM POLPA CÍTRICA PELETIZADA

RESUMO

As gramíneas tropicais em geral apresentam baixos teores de matéria seca (MS) e de carboidratos solúveis (CHOs), o que prejudica o processo de ensilagem, exigindo a adoção de técnicas que modifiquem este quadro, como é o caso da utilização de aditivos. Esse estudo objetivou conhecer o perfil fermentativo, químico e microbiológico das silagens de capim-Marandu na presença de polpa cítrica peletizada (PCP). O experimento foi conduzido nas dependências do Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP, utilizando o capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A. Rich) Stapf cv. Marandu) estabelecido em um Latossolo Vermelho Eutrófico típico textura muito argilosa a moderado caulítico-oxítico mesoférrico e colhido com 58 dias de crescimento. Foram utilizados silos experimentais de PVC adaptados com válvula do tipo Bunsen, atingindo densidade de 900 kg/m³. Os tratamentos constituíram-se de três quantidades de PCP (0, 5, 10% em relação a matéria natural) e sete tempos de abertura após a ensilagem (1, 4, 7, 14, 21, 28 e 56 dias). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 3x7, com três repetições. A presença de PCP aumentou os teores de CHOs, e apesar da baixa concentração de carboidratos nos tratamentos estudados proporcionaram silagens de qualidade satisfatória. O pH apresentou queda com o aumento das proporções do aditivo e estabilizou-se rapidamente a partir do quarto dia de ensilagem. Os teores de N-NH₃ (% N total) foram influenciados pela aplicação da PCP, porém mesmo sem a sua presença, esses teores foram baixos, não prejudicando a qualidade da silagem. Quanto a composição química, a utilização do aditivo aumentou os teores de PB, N-FDN, N-FDA e fração B3 e reduziu os teores dos constituintes da parede celular, aumentando os coeficientes de DIVMS. Com relação ao perfil microbiológico, os resultados mostraram crescimento da população de enterobactérias somente durante o primeiro dia de fermentação, devido a alta

densidade e condições ácidas alcançadas. Houve pequeno desenvolvimento de clostrídeos e dominância das bactérias homofermentativas em relação às heterofermentativas. O uso do aditivo melhorou o perfil fermentativo, microbiológico e a composição química das silagens de capim-Marandu. Apesar das silagens sem aditivo terem apresentado bom aspecto de conservação, seu uso é recomendado para prevenir perdas durante a ensilagem.

Palavras-chave: silagem, bactéria, fermentação, aditivo, gramínea

INTRODUÇÃO

A fermentação consiste na conversão de carboidratos solúveis em ácidos orgânicos, por meio de microrganismos inerentes ao próprio ambiente, no qual tendo encontrado condições adequadas, prevalecem.

Dos fatores que determinam o padrão de fermentação durante a ensilagem, os intrínsecos à planta forrageira são representados pelo adequado teor de umidade, elevado teor de carboidratos solúveis e o baixo poder tampão. Com relação aos fatores do meio, uma fermentação adequada só é garantida em ambiente de anaerobiose, pela adoção correta das técnicas da ensilagem, tais como o ponto de colheita, tamanho da partícula, rápido carregamento do silo, compactação para efetiva expulsão do oxigênio do interior do material, até a perfeita vedação do silo a fim de evitar a infiltração de ar e/ou água (Costa et al., 2001).

Os processos biológicos envolvidos na transformação da forragem úmida em silagem, em meio anaeróbio e na utilização da mesma são divididos em várias etapas. A primeira delas inicia-se quando a planta é colhida, e durante esta fase, os organismos aeróbios epifíticos convertem carboidratos solúveis em dióxido de carbono, água e calor. As próprias enzimas das plantas também promovem a hidrólise de amido e da hemicelulose a monossacarídeos. Desta forma, o oxigênio contido na massa ensilada é rapidamente consumido após o fechamento do silo. Sob condições ideais de umidade, tamanho de partícula e compactação a atividade aeróbia pode durar poucas horas (McDonald et al., 1991).

Segundo Woolford (1984) a fase aeróbia resulta em perdas de nutrientes, contudo, ela ajuda a criar um ambiente anaeróbio produzindo certas toxinas que podem servir para estender a estabilidade aeróbia da silagem durante a posterior utilização.

Quando quase todo o oxigênio é consumido durante a fase inicial aeróbia da ensilagem inicia-se a segunda fase, ou seja, a fermentação. As enterobactérias que se estabelecem por tolerarem o calor produzido na etapa anterior iniciam o processo fermentativo, seguidas pelas bactérias heterofermentativas. Esses dois grupos de microrganismos criam um ambiente favorável para as bactérias homofermentativas, que são viáveis em pH abaixo de 5,0. A queda no pH sinaliza o final da fase anaeróbia inicial, que geralmente ocorre entre 24 a 72 horas após a ensilagem (Woolford, 1984).

Pitt (1990) relatou que a queda no pH promove aumento da população de bactérias ácido-láticas homofermentativas, reduzindo o pH da silagem mais rapidamente devido à produção de ácido lático predominantemente.

O processo continua até a forragem apresentar um pH suficientemente baixo para inibir, mas não destruir o potencial de crescimento dos microrganismos. A fermentação natural realizada somente por organismos epifíticos leva de dez dias a três semanas. Esse tempo é condicionado pela capacidade tamponante, umidade e estágio de desenvolvimento da cultura ensilada (McDonald et al., 1991).

Capins tropicais caracterizam-se por apresentarem alta capacidade tamponante (miliequivalente de ácido requerido para alterar o pH de 1 kg de MS de 6,0 para 4,0). Assim, mais carboidratos solúveis são requeridos para que a massa possa atingir maiores teores de ácido lático, determinando valores de pH inibitórios à ação de microrganismos indesejáveis (Woolford, 1984).

Ainda, segundo Woolford (1984) forragens com umidade superior a 70% e baixo conteúdo de carboidratos solúveis, como é o caso das gramíneas tropicais, podem conduzir a condições desfavoráveis para a produção de ácidos que são

responsáveis pela redução do pH, tornando assim as condições favoráveis para a produção de ácido butírico e amônia, pela fermentação de clostrídeos.

No último estágio da fermentação, a fase estável, observa-se a finalização do processo de estocagem. Esta fase não é estática porque várias mudanças podem ocorrer dependendo de como as condições do ambiente, penetração de ar e tipos de organismos aeróbios variam na massa ensilada. Neste estágio, destaca-se como de maior importância o tipo e o nível da fermentação ácida presente na silagem (McDonald et al., 1991).

Este estudo objetivou conhecer o perfil fermentativo, químico e microbiológico das silagens de capim-Marandu na presença de polpa cítrica peletizada

MATERIAL E MÉTODOS

Localização e clima

O experimento foi conduzido nas dependências da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP.

A FCAV/UNESP está situada no município paulista de Jaboticabal, a 21° 15' 22" de latitude sul e 48° 18' 58" de longitude oeste de Greenwich e a uma altitude de 595 metros.

O clima é classificado como Cwa – mesotérmico de inverno seco, pelo sistema internacional de Koppen. Sendo assim, apresenta temperatura média anual máxima de 22,3 °C e mínima de 15,2 °C no mês mais frio. A precipitação pluvial média é de aproximadamente 1400 mm, com 85% das chuvas concentradas nos meses de outubro a março.

Corte e colheita da forragem

A *Brachiaria brizantha* cv. Marandu foi colhida em uma área localizada em um solo caracterizado como Latossolo Vermelho Eutrófico típico textura muito argilosa a moderado caulítico-oxítico mesoférico de relevo suave ondulado (Andrioli e Centurion, 1999), pertencente a FCAV/UNESP-Jaboticabal, cuja análise química

foi realizada no mês de Agosto de 2001, e sua composição é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química do solo da área experimental

pH em CaCl ₂	MO g/dm ³	P resina mg/dm ³ mmol _c /dm ³	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H ⁺ + Al ³⁺	SB	V %
5,5	28	24	4,3	26	15	30	45	59

Fonte: Laboratório de análise do solo – FCAV/UNESP

MO: matéria orgânica; SB: soma de bases; V: saturação por bases

Profundidade 0-20 cm

Anteriormente, a área havia sido fertilizada com 150 kg/ha de uréia no mês de Novembro de 2001, quando foi realizada uma colheita para a produção de silagem. Para tanto, foi efetuada uma nova aplicação de 150 kg/ha de uréia durante o mês de Janeiro de 2002, logo após o corte de rebaixamento da forragem.

A colheita foi realizada no dia 25 de Março de 2002 quando o capim apresentava 58 dias de crescimento vegetativo (Tabela 2), utilizando-se colhedora marca JF modelo Z10, regulada para que o corte fosse realizado a 15 cm do solo, obtendo-se tamanhos de partícula entre 2 a 5 cm. Deve-se destacar que este equipamento normalmente é empregado para colheita de culturas como milho e sorgo, devido a este fato, foram obtidos tamanhos de partícula inferiores aos das colhedoras utilizadas para o corte de capins tropicais.

Tabela 2. Características da forrageira no momento da ensilagem

Parâmetros	
Idade (dias)	58
Altura (cm)	105
Massa de forragem (t MS/ha)*	7,1
Folha (%)*	54
Caule (%)*	46

* Corte realizado a 15 cm do solo

Preparo das silagens

A forragem colhida foi submetida aos seguintes tratamentos: ensilagem do capim-Marandu diretamente após o corte; ensilagem do capim-Marandu + 5% de polpa cítrica peletizada (PCP) e ensilagem do capim-Marandu + 10% de PCP com base na matéria natural.

Para cada tratamento foi avaliado o perfil da fermentação, microbiológico e químico das silagens nos seguintes tempos após a ensilagem: 1, 4, 7, 14, 21, 28 e 56 dias.

Nos tratamentos com polpa cítrica peletizada, a sua adição ocorreu no momento anterior ao enchimento dos silos, efetuando-se perfeita homogeneização com a forragem colhida diretamente após o corte.

Para confecção dos 63 silos experimentais, foram utilizados canos de PVC com 50 cm de altura e 10 cm de diâmetro, com tampas de PVC apropriadas para garantir a vedação adequada. Na extremidade de cada silo foi instalada uma válvula do tipo Bunsen para escape dos gases produzidos.

A forragem foi compactada por meio de bastões de ferro, com acomodação de camadas de aproximadamente 10 cm de espessura atingindo densidade de 900 kg/m³. Com a acomodação final da forragem, os silos foram fechados e vedados com fitas plásticas adesivas, armazenados em local protegido em temperatura ambiente.

Análises químicas

As análises químicas da forragem e das silagens foram realizadas nos Laboratórios de Forragicultura e Nutrição Animal da FCAV/UNESP.

Decorridos cada período de fermentação, os silos foram abertos e todo o seu conteúdo foi despejado sobre uma bacia plástica. Posteriormente, o material foi homogeneizado, dividido em três frações, sendo colhidas amostras para a determinação das análises químicas e microbiológicas. A primeira fração foi utilizada para determinação dos teores de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) conforme a AOAC (1980), as concentrações de fibra em detergente neutro (FDN),

fibra em detergente ácido (FDA) e lignina pelo método seqüencial segundo as técnicas descritas por Robertson e Van Soest (1981). Para determinação dos teores de celulose foi utilizado ácido sulfúrico a 72% (Van Soest, 1994). Adotou-se o método seqüencial de análises de fibra para que não houvesse a contaminação da pectina na FDA das amostras. Os teores de hemicelulose foram calculados por diferença entre FDN e FDA, e a lignina calculada por diferença entre FDA e celulose. A partir dos resíduos da FDN e FDA foram procedidas as análises de N-FDN e N-FDA. A determinação da fração B3 foi calculada pela diferença entre o N-FDN e N-FDA. O teor de carboidratos solúveis (CHOs) foi determinado conforme Johnson et al. (1966). A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi estimada utilizando-se a metodologia de Tilley e Terry (1963). O poder tamponante foi mensurado de acordo com o método de Playne e McDonald (1966). A segunda porção foi levada para a prensa hidráulica para retirada do suco, o qual foi utilizado para determinar os teores de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) segundo AOAC (1980) e pH com o uso do potenciômetro (Silva, 1998). A terceira porção da amostra foi utilizada para as análises microbiológicas.

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas da forragem e da silagem foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia da FCAV/UNESP.

O preparo das amostras para análise microbiológica consistiu de uma diluição prévia, pesando-se 25 g de silagem (matéria verde) e adicionando a 225 ml de solução salina estéril (8,5 g de NaCl/litro de água destilada). Após agitação foram retirados 10 ml do extrato para as diluições posteriores. A partir dos extratos diluídos (10^{-1} a 10^{-5}) foram realizadas as sementeiras nos meios específicos para cada microrganismo estudado.

A contagem total de lactobacilos foi realizada segundo a metodologia de Jonsson (1991). O meio de cultura utilizado foi o Lactobacilli MRS Broth (Difco), sendo que as placas de Petri foram incubadas a 35°C por três dias em anaerobiose, em jarra com sistema Gas-pak. Para a diferenciação das bactérias

ácido-láticas em homofermentativas e heterofermentativas foi utilizada a metodologia proposta por McDonald et al. (1987), sendo as culturas incubadas a 30°C por três dias, nas mesmas condições anteriores. A presença de clostrídeos foi determinada segundo Tosi et al. (1982). O meio de cultura utilizado foi o Reinforced Clostridial Agar (Oxoid), e as culturas foram incubadas a 30°C por quatro dias, em anaerobiose. Para determinar o desenvolvimento de enterobactérias nas silagens foi utilizado como meio de cultura Violet Red Bile Agar (Oxoid), com incubação aeróbia por três dias em temperatura de 35°C, segundo Jonsson (1991).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições utilizando o esquema de parcelas subdivididas, sendo o fator das parcelas os tratamentos e o fator atribuído a subparcela o tempo. Os dados foram analisados utilizando o programa de Análise Estatística ESTAT, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, pelos procedimentos da análise de variância sendo que para comparação entre médias empregou-se o teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química da forragem fresca é apresentada na Tabela 3. A forrageira apresenta alto conteúdo de umidade e baixo teor de carboidratos, característico de gramíneas tropicais, podendo limitar a produção de silagem de alta qualidade, devido ao risco de surgirem fermentações indesejáveis. Ribeiro et al. (2002) estudando a planta de *Brachiaria decumbens* para a produção de silagem aos 56 dias de crescimento, encontrou valores de 25,5% de MS e 1,2% de CHOs.

São observados também elevados teores de carboidratos estruturais e de nitrogênio ligado a fibra. Isso se deve a espécie, condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento e principalmente ao avançado estágio de crescimento (58

dias) da cultura no momento da ensilagem. Esta maior participação dos constituintes da parede celular foi refletida em baixos valores de digestibilidade (46,2%). Reis (2000) avaliando a composição bromatológica do capim-Marandu em função da idade de corte, detectou que aos 60 dias de crescimento vegetativo a planta apresentava 83,7% de FDN, 43,5% de FDA, 5,6% de lignina, 31,2% de N-FDN e 26,5% de N-FDA, valores bem próximos ao encontrado no presente trabalho.

O objetivo deste estudo seria realizar a colheita quando a planta apresentasse cerca de 60 cm de altura, próximos aos 45 dias de rebrota, a fim de obter-se matéria prima para ensilagem de melhor qualidade, porém devido as condições climáticas (dias chuvosos), não foi possível colher a forrageira na data prevista.

Tabela 3. Composição química do capim-Marandu colhido aos 58 dias de crescimento

Parâmetro	Valor médio
MS (%)	22,9
CHOs (% MS)	1,1
Poder tampão (e mg/100g MS)	21,6
pH	5,9
N-NH ₃ (% N total)	3,6
PB (% MS)	10,7
N-FDN (% N total)	45,6
N-FDA (% N total)	10,4
B3 (% N total)	34,8
FDN (% MS)	75,2
FDA (% MS)	45,8
Hemicelulose (% MS)	29,4
Celulose (% MS)	40,8
Lignina (% MS)	4,9
DIVMS (%)	46,2

Tabela 4. Composição química da polpa cítrica peletizada

Parâmetro	Valor médio
MS (%)	88,5
CHOs (% MS)	18,6
PB (% MS)	7,8
FDN (% MS)	28,4
FDA (% MS)	22,7
Hemicelulose (% MS)	5,7
Celulose (% MS)	21,5
Lignina (% MS)	1,2
DIVMS (%)	72,4

Perfil da fermentação

A determinação da concentração de carboidratos solúveis em forragens permite observar a quantidade disponível de energia para produção de ácido láctico durante a ensilagem.

Os carboidratos solúveis são aqueles cujos os componentes são solúveis em água fria ou no conteúdo gastrointestinal (Van Soest, 1994). Segundo Cherney (2000) os carboidratos solúveis em água são constituídos pelos monossacarídeos, glicose e frutose e os oligossacarídeos, sacarose, galactose, melobiose, rafinose e ribose. A extração com água fria não rende amido, porque a amilose é parcialmente solúvel em água quente, enquanto a amilopectina não é solúvel em água (Van Soest, 1994).

O teor de CHOs das silagens foi influenciado pela adição de PCP ($P<0,05$) havendo pequeno aumento conforme foram adicionadas quantidades crescentes de PCP (Figura 1), o que possibilitou maior quantidade de substrato para os organismos presentes na silagem. Verifica-se também, que houve declínio na concentração de CHOs à medida que o tempo de ensilagem foi avançando ($P<0,05$). Observa-se redução significativa do primeiro para o décimo quarto dia na silagem controle, do primeiro para o sétimo dia para silagens com 5% de PCP e do primeiro para o quarto dia para as silagens com 10% de PCP.

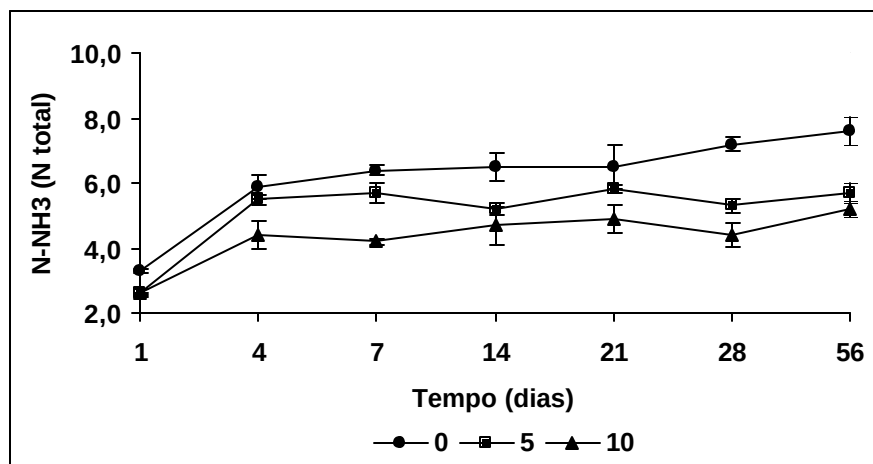
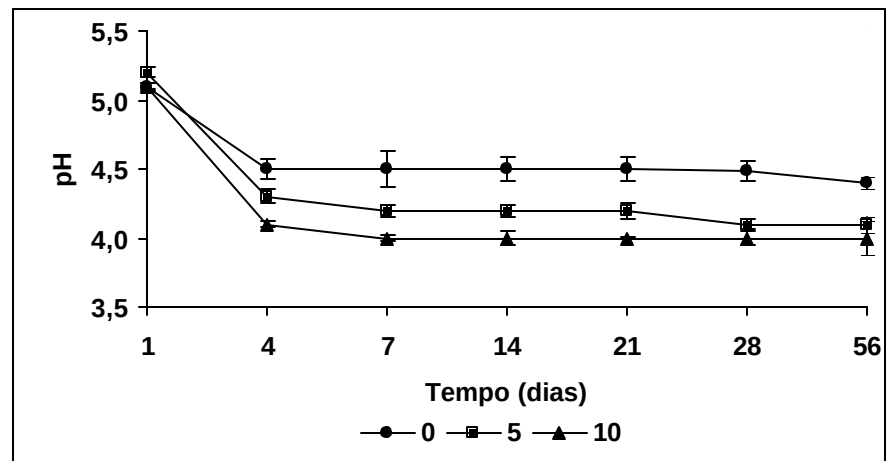
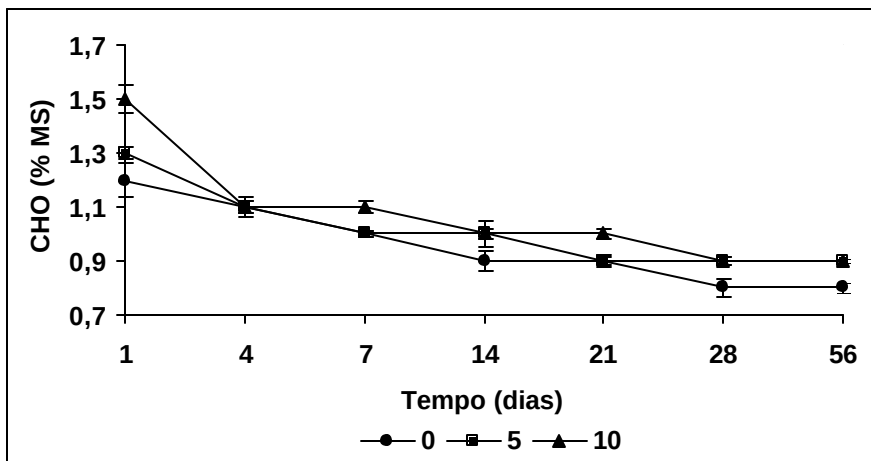


Figura 1. Variação temporal dos teores de CHOs, pH e N-NH₃ das silagens de capim-Marandu submetidas a adição de 0, 5 e 10% de polpa cítrica peletizada

Estudando o perfil da fermentação do capim-Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) com 60 dias de rebrota, ensilado com polpa cítrica peletizada, Silva (2002) observou que os valores de CHOs apresentaram sensível diminuição entre 30 e 40 dias após a ensilagem. Ao final de 60 dias, todo o carboidrato solúvel presente na silagem havia sido consumido durante a fermentação. A autora encontrou valores de CHOs ligeiramente superiores aos observados no presente estudo, 1,1% contra 2,5% MS. E relatou ainda que quando a forragem foi adicionada de 12% de PCP, foi observado aumento de três pontos percentuais no teor de CHOs, evidenciando a participação da polpa no aumento do teor de carboidratos fermentescíveis no alimento.

Tem sido enfatizado que as gramíneas tropicais possuem baixos teores de CHOs, os quais seriam insuficientes para a produção de silagens lácticas. Conforme Catchpoole e Henzel (1971) se o conteúdo de CHOs estiver abaixo de 15% na matéria seca, a produção de ácido láctico é muito limitada. Entretanto, segundo Winters et al. (1987) e Chamberlain (1987) durante a fase inicial de ensilagem enzimas das células vegetais são capazes de romper a estrutura celular e disponibilizar nutrientes para a fermentação.

Em estudos realizados com azevém (*Lolium multiflorum*) Chamberlain (1987) relatou que após 6-7 dias de ensilagem foi possível aumentar o teor de carboidratos solúveis em 30%, devido a quebra de ligações químicas dos carboidratos estruturais, principalmente da hemicelulose. Destacando, que a análise de carboidratos solúveis pode vir a subestimar o substrato disponível para a fermentação láctica. Em que, mesmo com teores de CHOs abaixo do recomendado (10-15%) é possível produzir silagens de qualidade satisfatória.

O pH de um alimento é um dos principais fatores capazes de determinar o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos nele presentes, além de empregado como parâmetro de qualidade do processo de ensilagem.

Na Figura 1 é possível constatar que a inclusão de PCP reduziu os valores de pH ($P < 0,05$) das silagens. Observa-se diminuição do primeiro para o quarto dia de ensilagem, para os três tratamentos estudados ($P < 0,05$). A partir do quarto dia de

ensilagem verifica-se que houve estabilização até o último dia observado (56 dias). Dessa forma, cada tratamento apresentou um valor médio de estabilização de 4,5 para silagens controle, de 4,2 para as silagens com 5% de PCP e de 4,0 para silagens com 10% de PCP.

É importante ressaltar que o pH de estabilidade, juntamente com a velocidade com que se declina durante o processo fermentativo, podem determinar os tipos de microrganismos que são capazes de crescer e dominar o ambiente. De acordo com os resultados obtidos e considerando exclusivamente o pH como fator restrito ao crescimento microbiano, pode-se inferir que as três silagens apresentaram fermentação de boa qualidade, com destaque para as silagens com 10% de PCP que apresentou pH limite (4,0) para o crescimento de microrganismos indesejáveis, principalmente do gênero *Clostridium*.

Silva (2002) estudando o comportamento do pH de silagens de capim-Tanzânia adicionadas de PCP (0, 3, 6, 9 e 12%) também observou que a partir do terceiro dia de ensilagem até o sexagésimo dia houve estabilização do pH para todos os tratamentos. Aguiar et al. (2001) obtiveram redução no valor de pH nas silagens de capim-Tanzânia adicionadas de doses crescentes de PCP (0, 5 e 10%) atingindo valores finais de pH de 5,6, 4,9 e 4,9, respectivamente.

Possivelmente, as propriedades absorventes e o fornecimento de carboidratos pela PCP colaboraram para a redução do pH das silagens que receberam o aditivo. Assim, com o aumento da pressão osmótica (inibidor para os clostrídeos) e aumento da disponibilidade de nutrientes as bactérias ácido-láticas, o teor de ácido láctico teoricamente poderia ser maior nas silagens aditivadas. Segundo Corlett Jr. e Brown (1980) o ácido láctico produzido aumenta a concentração de H^+ reduzindo o pH em níveis onde as bactérias indesejáveis são inibidas.

O efeito da inclusão de PCP é largamente observado na literatura, concordando com os resultados obtidos por Evangelista et al. (2001), Pedreira et al. (2001) e Igarasi (2002), que concluíram que o aumento nos teores de matéria seca e dos carboidratos solúveis no material, em comparação com o tratamento controle, possibilitou melhor conservação da silagem.

Uma das principais alterações na ensilagem é o aumento do nitrogênio amoniacal (N-NH_3) em relação ao nitrogênio total que é afetado por ação de microrganismos. Esse parâmetro juntamente com a concentração de ácidos orgânicos e o pH, é utilizado para definir a qualidade do processo fermentativo.

Segundo McGechan (1989) maiores teores de N-NH_3 indicam maior intensidade de proteólise, e isto se deve principalmente pela fermentação dos aminoácidos pelos clostrídeos proteolíticos via deaminação de valina e leucina e reações de oxi-redução entre alanina e glicina.

Os teores de N-NH_3 observados no presente experimento estão apresentados na Figura 1. Houve efeito significativo ($P < 0,05$) na produção N-NH_3 para os diferentes tratamentos e entre tempos de ensilagem, sendo que a adição de PCP reduziu os teores de N-NH_3 conforme o acréscimo da quantidade do aditivo. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Igarasi (2002), que estudou as silagens de capim-Tanzânia adicionadas de PCP (15%), e verificou que esta quantidade de aditivo elevou os teores de matéria seca (29,9%) e também de atividade de água (0,96), reduzindo assim os valores de N-NH_3 em relação às silagens controle. O autor atribui a redução da atividade de água e o fornecimento de CHOs pela PCP, como os principais fatores que proporcionaram a diminuição na produção de amônia, uma vez que os clostrídeos são sensíveis a alta pressão osmótica e as condições relativamente ácidas ($\text{pH} < 4,2$).

Entre os tempos de ensilagem observou-se que para as três silagens em estudo houve aumento dos teores de N-NH_3 do primeiro até o quinquagésimo sexto dia ($P < 0,05$). Silva (2002) verificou a mesma tendência para silagens de capim-Tanzânia adicionadas de PCP, constatando aumento linear na produção de amônia, não sendo observada nenhuma tendência de estabilização.

Segundo Woolford (1984) e McDonald et al. (1991) a proteólise se estende durante a fermentação quando não ocorrem condições ácidas suficientes para que os microrganismos indesejáveis sejam inibidos. Entretanto, no presente estudo, as condições ácidas foram rapidamente estabelecidas, principalmente quando a PCP

foi adicionada à forragem. Porém, a faixa de pH alcançada para as três silagens (4,0 a 4,6) não foram suficientes para inibir a atividade proteolítica.

Possivelmente, a produção de amônia pode ser devido ao baixo teor de carboidratos solúveis presente no alimento, em que as bactérias ácido-láticas estariam utilizando aminoácidos como fonte de energia para crescimento e metabolismo. Pois, segundo McGechan (1989) e McDonald et al. (1991) as bactérias ácido-láticas normalmente não são proteolíticas, porém agem como tal quando tem limitado teor de nutrientes ou baixo poder de síntese de aminoácidos sendo necessário um suprimento extra. Sua habilidade em fermentar aminoácidos é restrita a serina e arginina e os produtos obtidos de arginina são ornitina, CO_2 e NH_3 e da serina são acetona, CO_2 e NH_3 .

Vale também ressaltar que as silagens são classificadas como muito boas quando os valores de NNH_3 são inferiores a 10%, assim nos três tratamentos estudados foram observados valores inferiores a esta faixa.

Composição química

Em forragens frescas, 75 a 90% do total do nitrogênio presente está na forma de proteínas, o restante é encontrado principalmente como peptídeos, aminoácidos livres, aminas, nucleotídeos, clorofila e nitratos. Nas silagens a extensão da degradação da proteína verdadeira varia com a espécie da planta, com a taxa de mudança do pH, com o conteúdo de matéria seca e temperatura (McDonald et al, 1991).

O teor de proteína bruta foi influenciado ($P < 0,05$) pela adição de PCP, havendo ligeiro aumento no conteúdo de PB com a adição de PCP nas silagens (Figura 2) passando de 9,3% para 9,7%, no tratamento controle e com 10% de PCP, respectivamente. Este acréscimo no teor de PB não era esperado, pois a PCP possui valores de PB (7,8) inferiores ao da forragem avaliada. Possivelmente, as silagens que não receberam PCP podem ter sofrido ligeiro aumento de temperatura nas primeiras horas de ensilagem, o que acarretou perdas de nitrogênio na forma de amônia por volatilização.

Não foi observada significância ($P>0,05$) para a interação tratamento x tempo em relação aos teores de PB. Os valores oscilaram muito durante os tempos de ensilagem, porém com pequena amplitude. Silva (2002) estudando silagem de capim-Tanzânia observou pequena redução nos teores de PB (9,3% para 8,7%) do primeiro para sexagésimo dia de ensilagem. As silagens controle apresentaram maior redução nos teores de PB durante os tempos de fermentação quando comparado com os demais tratamentos. Este fato reforça a relação entre presença de umidade e ocorrência de fermentação indesejável, uma vez que as silagens que apresentaram maiores teores de matéria seca, tiveram menores valores de N-NH₃ e maiores de PB, ou seja, a atividade proteolítica dos microrganismos foi mais inibida. Este fato é amplamente discutido por Igarasi (2002), o qual indica que menores valores de atividade de água são traduzidos em menores teores de N-NH₃, quer seja pela adição de PCP, como também pela pré-secagem da forragem no campo.

Outro fator que poderia colaborar para a redução dos teores de PB da silagem seria a ação das enzimas proteolíticas das plantas, pois segundo McDonald et al. (1991) a hidrólise das proteínas pode levar os teores de nitrogênio solúvel para mais de 50% em relação ao nitrogênio total. Isso, contribui para o aumento das perdas de nitrogênio por lixiviação em forragens com alto teor de umidade, como é o caso das gramíneas tropicais.

Segundo Cherney (2000) a simples determinação da concentração de PB é inadequada para descrever a qualidade da proteína presente na forragem. Licitra et al. (1996) propôs o uso de uma série de fracionamentos químicos, identificando cinco componentes nitrogenados na proteína bruta, sendo que a base para o fracionamento está associado à disponibilidade nutricional.

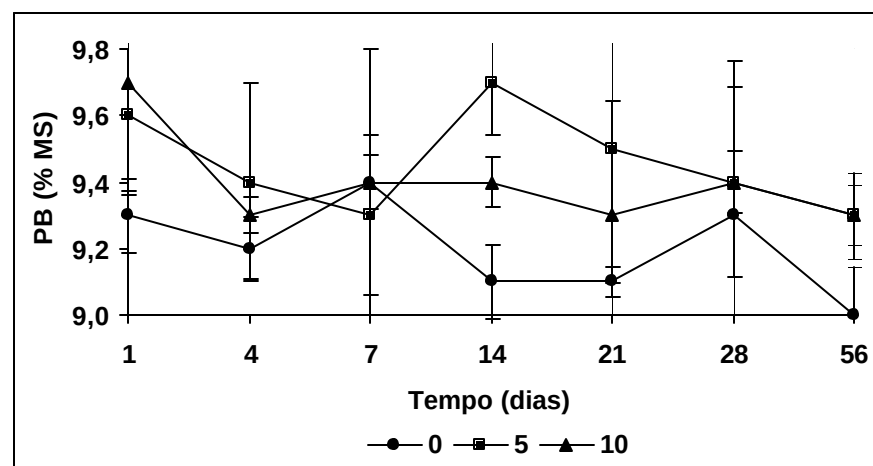
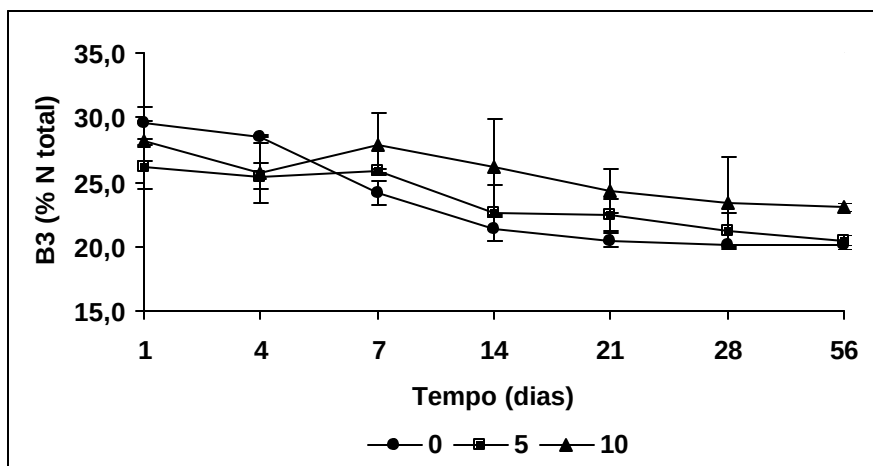
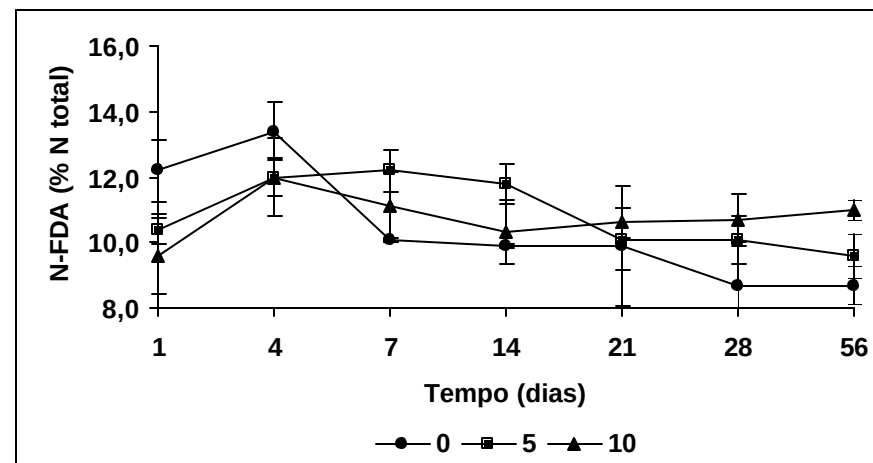
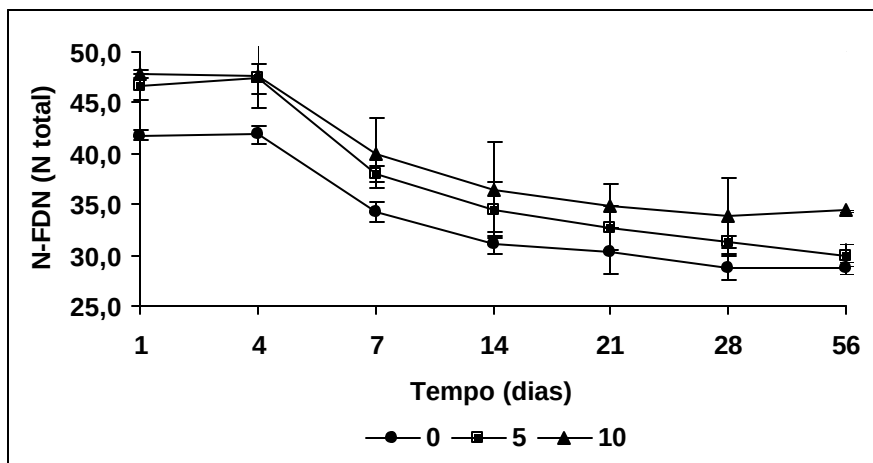


Figura 2. Variação temporal dos teores de N-FDN, N-FDA, fração B3 e PB das silagens de capim-Marandu submetidas a adição de 0, 5 e 10% de polpa cítrica peletizada

O nitrogênio ligado a FDN sofreu ligeiro aumento ($P<0,05$) com a participação da PCP durante a ensilagem (Figura 2). Este fato pode ter ocorrido porque durante o processo de industrialização os constituintes da PCP (casca, sementes e polpa) sofrem prensagens e posterior secagem a alta temperatura. O super aquecimento na presença de carboidratos solúveis e frações nitrogenadas, produzem os polímeros de Maillard, o que aumenta os teores de nitrogênio ligado a parede celular.

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os encontrados na literatura (Aguiar et al. 2001; Igarasi 2002 e Castro 2002). Segundo Balsalobre et al. (2001) o N-FDN tem ampla variação entre análises bromatológicas, encontrando-se valores entre 25 a 70%, sendo a maior frequência na faixa de 40 a 60% do nitrogênio total. Nussio et al. (2002) relataram que em gramíneas tropicais, na forragem fresca uma considerável porção da fração nitrogênio total está ligada à parede celular, e que esses valores são considerados elevados e compatíveis com forragens submetidas ao super aquecimento, entretanto, destacam que nesse caso este tipo de ligação é de ocorrência natural.

Os valores de N-FDN permaneceram praticamente estáveis até o quarto dia após a ensilagem. Entretanto, após este tempo foi observada queda acentuada ($P<0,05$) na concentração de nitrogênio ligado a FDN nas três silagens estudadas. Possivelmente, por consequência da degradação da hemicelulose, ocasionando a liberação do nitrogênio ligado a esta fração da parede celular.

Em relação ao nitrogênio complexado a FDA (Figura 2) observou-se aumento numérico desses teores com a adição de PCP, porém não foi observado significância ($P>0,05$). O motivo pelo qual os teores de N-FDA tenham aumentado também pode ser devido a elevação na concentração de PB das silagens que receberam PCP. Os teores de N-FDA sofreram aumento do primeiro para o quarto dia de ensilagem ($P<0,05$) nos três tratamentos. A partir do quarto dia até o quinquagésimo sexto dia, houve considerável variação nos valores de N-FDA. As silagens que não receberam PCP apresentaram queda do primeiro para o quinquagésimo sexto dia, enquanto que as silagens que receberam 5% de PCP

também apresentaram ligeira queda, sendo que as silagens que receberam 10% de PCP foi observado ligeira alta quando comparado o primeiro e o quinquagésimo sexto dia de ensilagem. Apesar de haver tendência de desequilíbrio durante os tempos de fermentação, os valores variaram dentro de uma pequena faixa de concentração de N-FDA.

A fração protéica B3 consiste na parcela do nitrogênio insolúvel em detergente neutro e solúvel em detergente ácido, sendo estimada pela subtração entre as frações de nitrogênio ligado a FDN e a FDA.

Na Figura 2 estão apresentados os valores da fração B3 observados durante os tempos de ensilagem. Houve efeito significativo ($P < 0,05$) para adição de PCP, assim como os observados nos teores de NFDN e N-FDA. A interação entre tratamento x tempo também foi significativa ($P < 0,05$), verificando-se diminuição nos conteúdos desta fração durante os tempos de ensilagem. Em face desta observação pode-se inferir que a fração B3 tem sua importância nas reações proteolíticas ocorridas durante a ensilagem, pois foi verificado aumento nos teores de N-NH_3 (Figura 1) e queda na concentração de N-FDN e fração B3. Este mesmo comportamento também foi verificado por Aguiar et al. (2001) e Igarasi (2002), que observaram relação inversa entre teor de N-NH_3 e fração B3. Segundo Igarasi (2002) outras frações nitrogenadas poderiam se comportar como substratos mais disponíveis para a proteólise durante a ensilagem, porém o desaparecimento da fração B3 e respectivo aumento nos teores de amônia parecem apresentar correspondência.

Segundo Van Soest (1994) as frações celulose, hemicelulose e lignina, além de cutina e sílica em forragens é representada pela FDN. O teor de FDN é um importante parâmetro que define a qualidade da forragem, pois é um dos fatores que afeta a capacidade de ingestão por parte dos animais.

Os valores obtidos para FDN nas silagens estão apresentados na Figura 3. Observa-se que à medida que a PCP foi adicionada a forragem, houve diminuição ($P < 0,05$) nos teores de FDN. Isto está relacionado ao efeito de diluição para este parâmetro, já que a PCP apresenta valores inferiores de FDN comparado com a

forrageira. Não houve significância para a interação tratamento x tempo ($P > 0,05$). Entretanto, observou efeito de queda nos teores de FDN nas três silagens à medida que os tempos de ensilagem ($P < 0,05$) avançaram.

A hemicelulose é compreendida como um carboidrato estrutural formada por uma cadeia principal de xilanas com ligações β 1-4, com cadeias laterais de ácido metil glucurônico, e freqüentemente glicose, galactose e arabinose (Van Soest, 1994).

Observou-se redução ($P < 0,05$) nos teores de hemicelulose com a adição de PCP à forragem no momento da ensilagem (Figura 3), ocorrendo decréscimo de hemicelulose à medida que participação da PCP aumentou na proporção. Não houve efeito significativo para a interação tratamento x tempo, porém pode-se observar que os valores de hemicelulose apresentaram queda durante a fermentação ($P < 0,05$) nos três tratamentos estudados, como também foi observado para os valores de FDN.

Esse fato pode ser justificado devido à hidrólise ácida da hemicelulose, que segundo (McDonald et al., 1991) tem como principais fatores: a atividade da hemicelulase presente na forragem, esta mesma enzima produzida pelas bactérias e a hidrólise devido a presença de ácidos produzidos durante a fermentação. Segundo estes autores, metade da hemicelulose contida na forragem pode ser hidrolisada e a maior parte da hidrólise ocorre na fase inicial da ensilagem. No presente trabalho houve redução de 7, 4 e 8% no teor de hemicelulose para os tratamentos com 0, 5 e 10% de PCP, respectivamente, do primeiro para o quinquagésimo sexto dia de fermentação. Sendo que grande parte do processo ocorreu nos primeiros quatorze dias de ensilagem.

Segundo Van Soest (1994) a fibra em detergente ácido (FDA) em forragens é compreendida pelas frações de celulose e lignina.

Os teores de FDA apresentaram o mesmo comportamento que a FDN quanto a participação da PCP durante a ensilagem, ou seja, a adição de PCP diminuiu os teores de FDA ($P < 0,05$). Durante o processo fermentativo os valores de FDA

mantiveram-se praticamente estáveis ($P>0,05$) para todos os tratamentos e tempos de ensilagem.

A celulose é um polímero linear formado por D-glicose, com ligações do tipo β 1-4, apresentando alto peso molecular, sendo o mais abundante carboidrato existente no mundo (Van Soest, 1994).

A adição de PCP promoveu pequeno decréscimo nos valores de celulose das silagens ($P<0,05$). Durante o processo fermentativo não foi observado diferença significativa para a interação tratamento x tempo. Os valores mantiveram-se estáveis ao longo dos tempos de ensilagem observados (Figura 3). Este comportamento já era esperado, pois a celulose sofre pouco ou quase nenhum efeito durante a fermentação. Segundo Reis e Jobim (2001) os resultados de pesquisa tem demonstrado que em silagens de gramíneas uma pequena fração (menos de 5%) da celulose sofre degradação pelo efeito das enzimas.

A lignina é o principal fator que limita a disponibilidade da parede celular da planta para os animais. Todavia, permanece um enigma devido à dificuldade de sua caracterização bioquímica, pois é o único polímero da planta cujos subcomponentes não são claramente conhecidos (Van Soest, 1994).

Foi constatado efeito significativo ($P<0,05$) da adição de PCP em relação aos teores de lignina. Assim como para todos os outros componentes da parede celular, os valores de lignina tiveram decréscimo com a participação da PCP durante a ensilagem (Figura 4). Ao longo dos tempos de fermentação houve pequena variação na quantidade de lignina nas silagens estudadas, de forma que não foi observado efeito significativo ($P>0,05$).

Van Soest (1994) relatou que a celulose e a lignina se mantêm estáveis nas fermentações no interior do silo e que estas frações só são perdidas quando se observa presença de fungos.

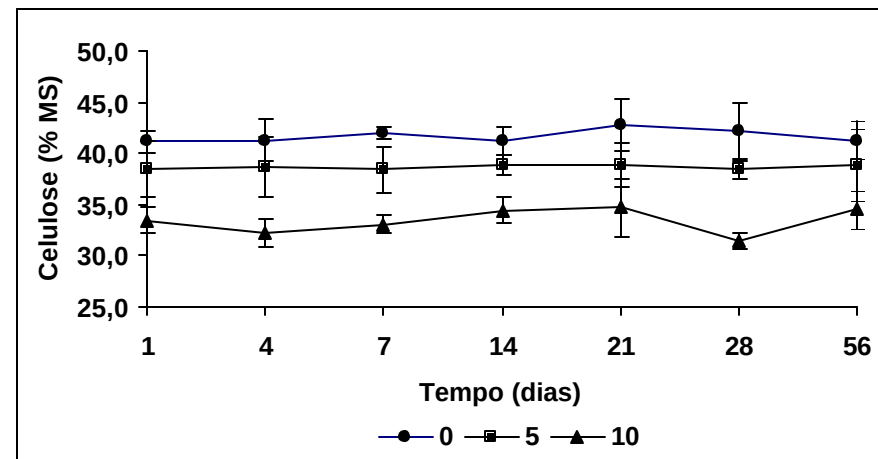
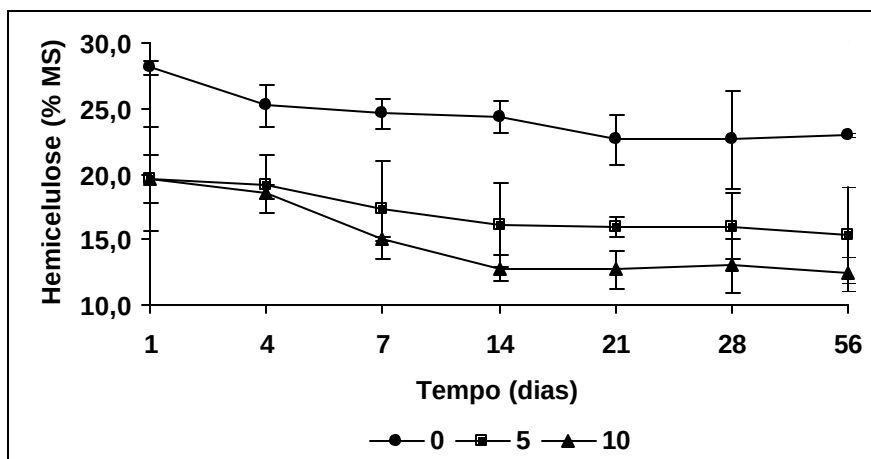
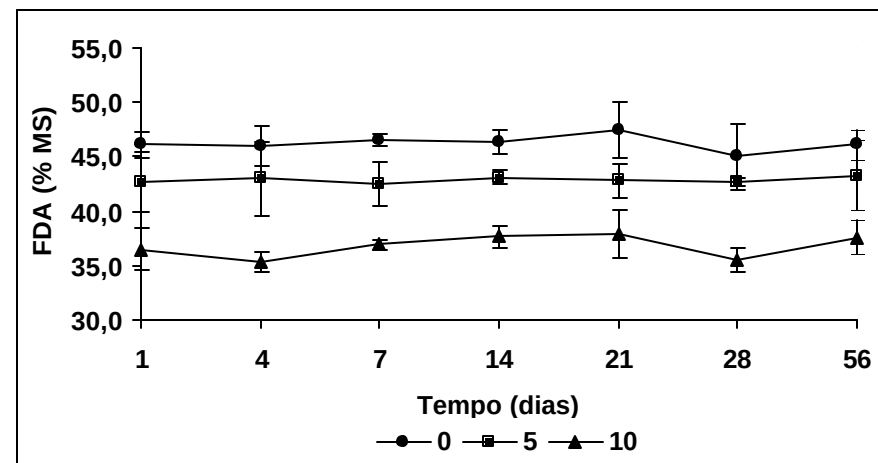
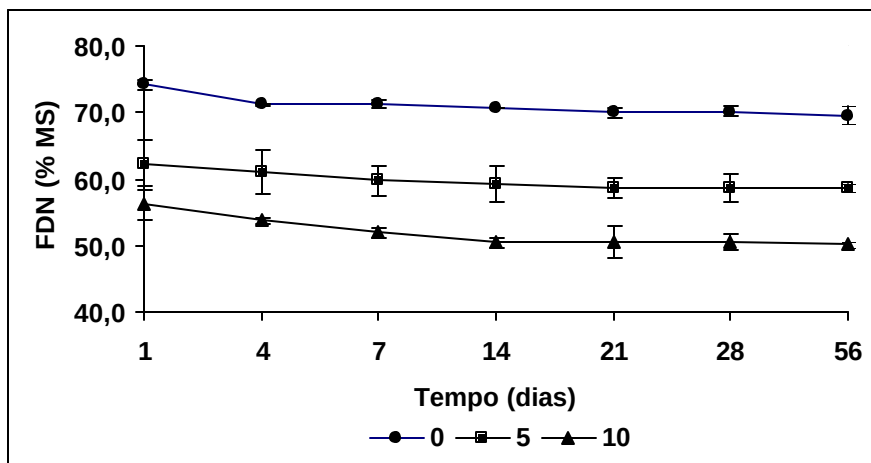


Figura 3. Variação temporal dos teores de FDN, FDA, hemicelulose e celulose das silagens de capim-Marandu submetidas a adição de 0, 5 e 10% de polpa cítrica peletizada

A adição de PCP promoveu aumento nos valores de DIVMS (Figura 4), ocorrendo efeito significativo entre os tratamentos ($P < 0,05$). Este fato pode ser justificado devido aos altos teores de parede celular que a forragem apresentava, os quais agem diretamente na digestibilidade. Consequentemente, as silagens aditivadas apresentaram melhora na digestibilidade, pelo fato da PCP ter reduzido os valores da FDN, da FDA, da hemicelulose, da celulose e da lignina e elevado os teores de PB e CHOs. Além de ter promovido condições mais favoráveis ao perfil de fermentação, diminuindo a proteólise pela queda mais acentuada do pH e ainda aumentando os efeitos da hidrólise da hemicelulose. Outro fato que poderia explicar os maiores coeficientes de digestibilidade das silagens de receberam PCP, seria o maior teor de ácido láctico destas silagens. De acordo com Van Soest (1994) o lactato é degradado no rúmen produzindo 2 ATPs durante a fermentação ruminal, ou seja, gera a metade de energia quando comparado à glicose (4 ATPs), sustentando assim crescimento microbiano.

Não houve significância para a interação tratamento x tempo ($P > 0,05$), sendo que a digestibilidade das silagens mantiveram-se estáveis ao longo dos tempos de fermentação.

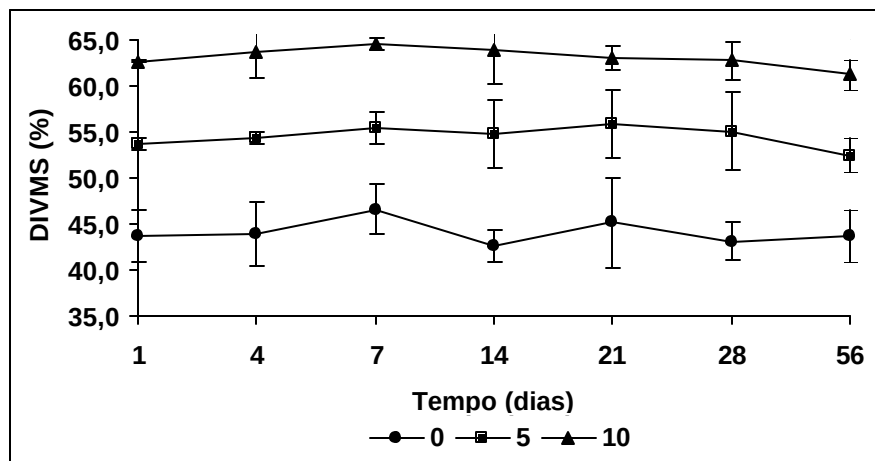
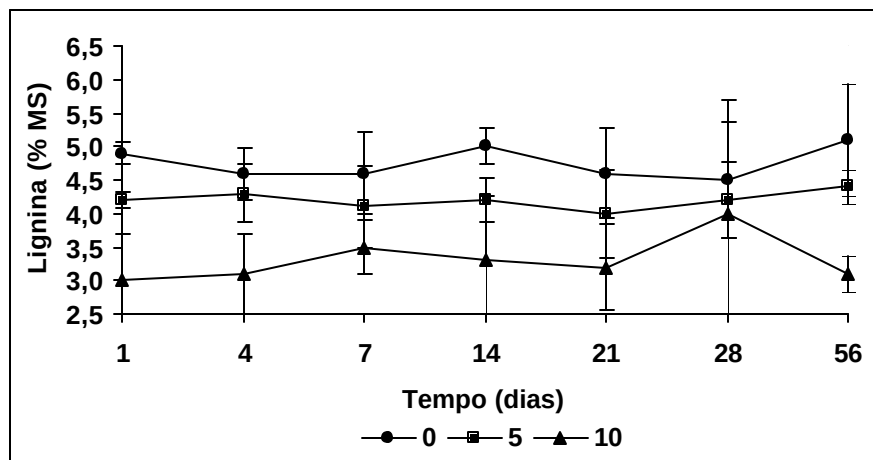


Figura 4. Variação temporal da lignina e DIVMS das silagens de capim-Marandu submetidas a adição de 0, 5 e 10% de polpa cítrica peletizada

Perfil microbiológico

As enterobactérias são um grupo de microrganismos indesejáveis na silagem devido ao seu potencial de competição por carboidratos solúveis com as bactérias ácido-láticas, propiciando menor contribuição para acidificação da forragem, além de promover deaminação durante a proteólise (McDonald et al., 1991). Entretanto, a sua presença se faz necessária, pois contribuem para o consumo de oxigênio residual durante as primeiras horas de ensilagem, criando assim condições favoráveis para que as bactérias ácido-láticas se desenvolvam.

No primeiro dia de fermentação (Figura 5) pode-se verificar que houve aumento na população de enterobactérias para todos os tratamentos, sendo que após o quarto dia de ensilagem não foi detectada a presença deste grupo de microrganismo. Desta maneira, pode-se inferir que um ou mais fatores podem estar agindo sobre o seu crescimento. Possivelmente, o pH esteja inibindo sua sobrevivência, já que as enterobactérias são sensíveis a sua queda, conforme é observado na Figura 1, no qual verifica-se que o pH tem uma sensível queda após o quarto dia de ensilagem. Ostling e Lindgren (1995) destacam que as enterobactérias normalmente crescem extensivamente durante os primeiros dias de ensilagem, mas sua população decresce rapidamente a medida que o meio é acidificado.

Outro fator que pode estar afetando a sobrevivência destas bactérias após o primeiro dia de ensilagem é a baixa tensão de oxigênio presente no alimento. Segundo Montville (1997) os microrganismos são classificados em aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios, em função da capacidade de utilizarem ou não o oxigênio como receptor final de elétrons no metabolismo respiratório. Os anaeróbios facultativos, como é o caso das enterobactérias podem utilizar o oxigênio como receptor final de elétrons, mas na sua ausência desenvolvem um processo no qual os compostos orgânicos são sucessivamente oxidados e reduzidos, porém com alterações pronunciadas no metabolismo. Em função deste comportamento, essas bactérias revelam uma capacidade de crescimento em valores mais reduzidos de oxi-redução, entretanto, não suportam condições de

anaerobiose como foi alcançada durante o processo de ensilagem, devido aos altos valores de densidade das silagens (900kg/m^3).

Esse comportamento pode ser verificado de acordo com os resultados de Ostling e Lindgren (1995), nos quais o estudo sobre silagem de gramíneas de clima temperado, observaram maior número de enterobactérias um dia após o início da fermentação. Dois dias após a ensilagem o número dessas bactérias foi 2% menor em relação ao primeiro dia, e após quatro dias não foi detectada a presença de enterobactérias nas silagens.

Quando a acidez não é suficiente para prevenir a multiplicação dos clostrídeos, ocorre o que se chama de fermentação secundária. Esta fermentação é realizada por bactérias do gênero *Clostridium*, capazes de produzir ácido butírico a partir da glicose e do ácido láctico, além de degradarem proteínas produzindo amônia e outros compostos (McDonald et al. 1991).

Na Figura 5 pode-se observar que a presença de PCP elevou a população de clostrídeos no momento da ensilagem, possivelmente pela contaminação do aditivo com esporos da bactéria, porém logo promoveu a queda da população durante o processo fermentativo. Esse resultado é o efeito benéfico causado pela elevação da matéria seca e diminuição da atividade de água das silagens pela presença da PCP. A atividade de água (A_w) é uma medida de disponibilidade de água para o crescimento de microrganismos, e a sua redução tem marcado efeito sob a população de clostrídeos nos alimentos. Segundo Dodds e Austin (1997) os níveis mínimos de A_w que permitem o crescimento de algumas espécies de clostrídeos está entre 0,95 e 0,97. Esse fato confirma a constatação de Igarasi (2002) que encontrou A_w de 0,94 e 0,98 para silagens produzidas na seca e nas águas, respectivamente, verificando menores teores de nitrogênio amoniacal naquelas produzidas durante o inverno.

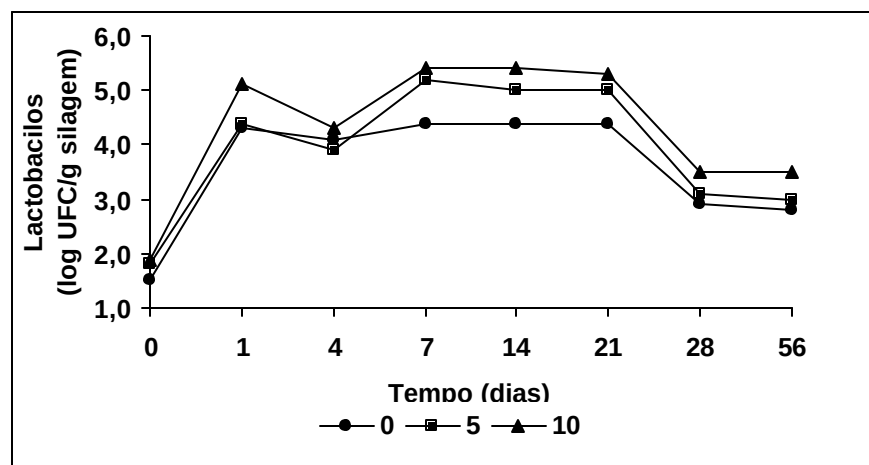
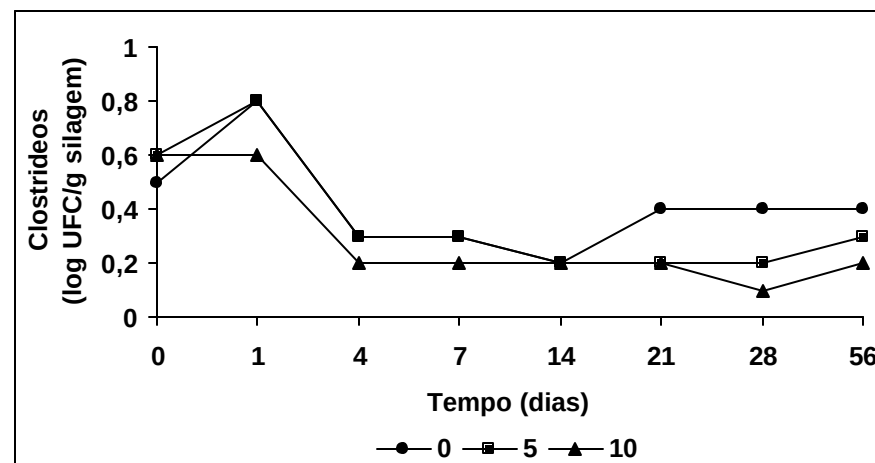
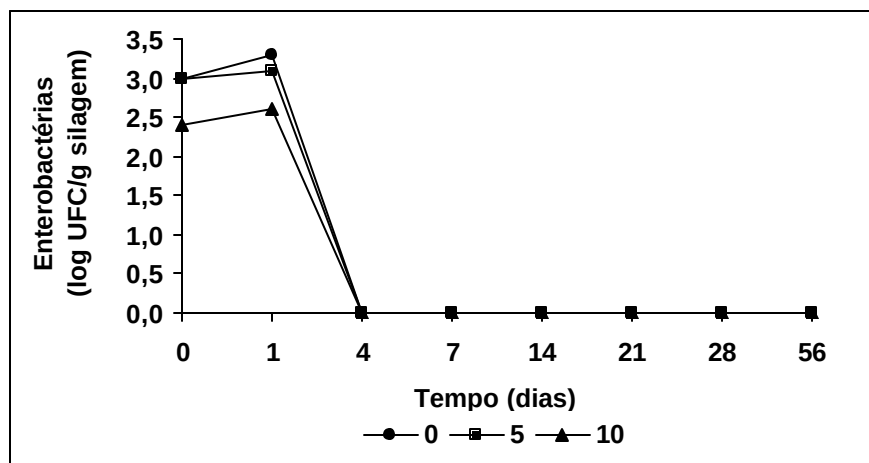


Figura 5. Dinâmica microbológica das silagens de capim-Marandu submetidas a adição de 0, 5 e 10% de polpa cítrica peletizada

Após vinte e quatro horas de fermentação verifica-se que houve aumento na população de clostrídeos para os tratamentos com 0% e 5% de PCP. O tratamento que recebeu 10% de PCP manteve-se estável após este tempo. Do primeiro para o quarto dia de ensilagem a população sofreu acentuada queda para todos os tratamentos, mantendo-se estável até o décimo quarto dia para o tratamento com 0% de PCP e até o vigésimo oitavo dia para os tratamentos com 5% e 10% de PCP. Este fato pode ser justificado em função da sensibilidade que estes microrganismos apresentam a queda do pH, o qual apresentou decréscimo a partir do quarto dia de ensilagem para todos os tratamentos observados (Figura 1). Foi constatada uma instabilidade da população a partir do décimo quarto dia para as silagens com 0% de PCP e vigésimo oitavo dia para as silagens com 5 e 10% de PCP. Tal fato pode ter ocorrido pelo aumento na capacidade tamponante das silagens, devido a produção de ácidos orgânicos, porém não foi observado aumento de pH para os respectivos tempos de fermentação.

Apesar de ter ocorrido aumento na população de clostrídeos nos estágios finais de ensilagem, o número de unidade formadora de colônia (UFC) é considerado baixo durante todo o processo fermentativo (0,2 a 0,8 UFC/g de silagem). Esse fato pode ser comprovado pelos baixos teores de N-NH_3 verificados para as três silagens em estudo (Figura 1).

Os lactobacilos são o grupo de microrganismos desejáveis na produção de uma boa silagem, ou seja, os produtos finais de seu metabolismo são essenciais para que uma fermentação de boa qualidade seja obtida (Woolford, 1984).

A adição de PCP promoveu pequeno aumento na população de lactobacilos no momento da ensilagem e durante o processo fermentativo (Figura 5). Após vinte e quatro horas de ensilagem as três silagens apresentaram acréscimo na população de lactobacilos, com tendência de queda para o quarto dia e aumento para o sétimo dia de ensilagem. A partir do sétimo dia de ensilagem verifica-se a estabilização da população até o vigésimo oitavo dia. Após este tempo a população retoma sua queda até o quinquagésimo sexto dia. Como o grupo de lactobacilos envolve bactérias homo e heterofermentativas, e consequentemente

variado grupo de espécies em relação à tolerância ao pH, pode-se inferir que este comportamento possivelmente envolve alternância entre os dois grupos e isso se deve ao crescimento e/ou inibição de determinadas espécies durante o processo fermentativo.

Segundo McDonald et al. (1991) o número de bactérias ácido-láticas requerido para que ocorra acentuada queda de pH é de aproximadamente 8,0 log UFC/g de silagem. No entanto, vários autores tem registrado populações iniciais entre 3,7 e 6,3 log UFC/g de silagem em várias culturas, com boa conservação da forragem ensilada (Higginbotham et al. 1998; Driehuis et al. 2001 e Whiter e Kung Jr. 2001). Pelos dados encontrados no presente estudo a população no momento da ensilagem não seria suficiente para proporcionar efetiva produção de ácido láctico. Porém, a partir do primeiro dia de fermentação o número de microrganismos aumentou, apresentando-se dentro da faixa necessária para uma rápida acidificação.

Na Figura 6 encontram-se as proporções de bactérias homo e heterofermentativas em relação a população de lactobacilos.

No momento anterior a ensilagem e após um dia de fermentação observou-se ampla dominância de bactérias heterofermentativas para todos os tratamentos. Após o quarto dia de ensilagem, houve o desenvolvimento crescente de bactérias homofermentativas até o quinquagésimo sexto dia. Em média 80, 60 e 70% das bactérias foram classificadas como homofermentativas para os respectivos tratamentos 0, 5 e 10% de PCP no quinquagésimo sexto dia de fermentação. Este fato está de acordo com a literatura, a qual relata-se que no final do processo fermentativo há predomínio de bactérias homofermentativas. De acordo com McDonald et al. (1991) quando o pH da silagem atinge valor inferior a 5,0 a população de bactérias ácido-láticas heterofermentativas diminui em função da acidez inibitória ao seu crescimento. Com a contínua queda do pH há aumento na população de bactérias homofermentativas, as quais são mais eficientes (produzem somente ácido láctico), levando a redução mais rápida do pH.

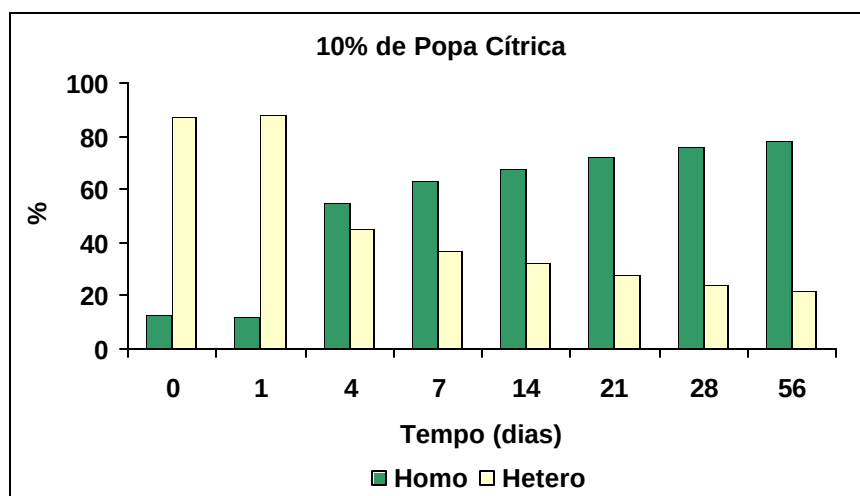
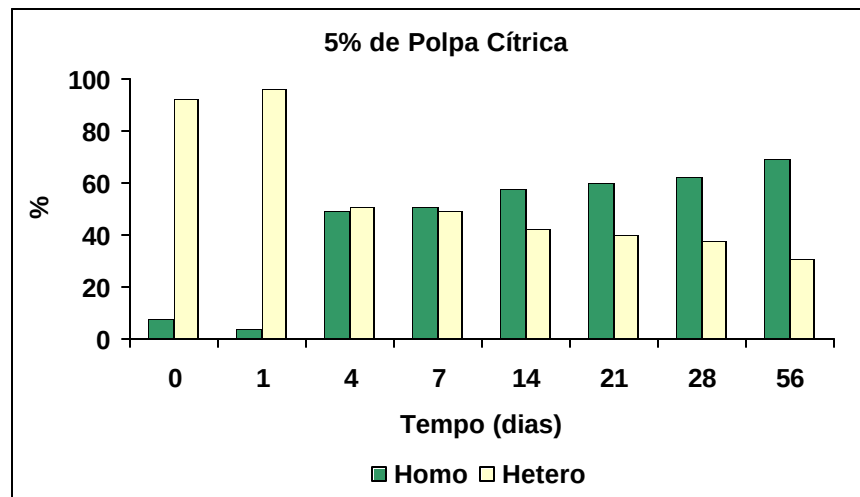
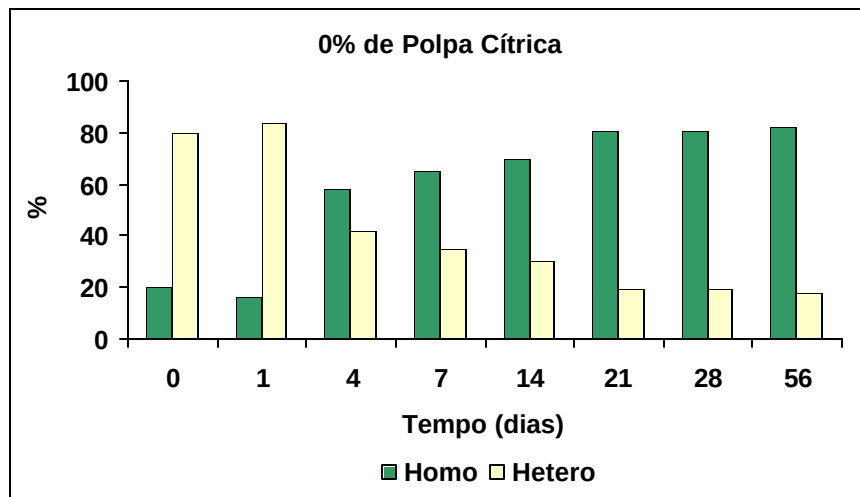


Figura 6. Ocorrência de bactérias homo e heterofermentativas nas silagens de capim-Marandu submetidas a adição de 0, 5 e 10% de polpa cítrica peletizada

CONCLUSÕES

A alteração do teor de matéria seca pela presença da polpa cítrica durante a ensilagem aumentou o teor de carboidratos solúveis, promoveu ganhos no processo de fermentação e diminuiu os valores de pH e nitrogênio amoniacal.

A composição química das silagens foi significativamente alterada pela adição da polpa cítrica, aumentando os coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

Houve predomínio de bactérias ácido-láticas homofermentativas em relação as heterofermentativas, durante a maior parte do período de fermentação.

O crescimento restrito de enterobactérias e clostrídeos durante o processo fermentativo, caracterizou as silagens como bem conservadas.

Apesar das silagens sem aditivo terem apresentado bom aspecto de conservação, seu uso é recomendado para prevenir perdas durante a ensilagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R. N. S., CRESTANA, R. F., NUSSIO, L. G. et al. Efeito do tamanho de partícula na composição da fração nitrogenada de silagem de capim-Tanzânia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:SBZ, 2001. CD ROM.

ANDRIOLI, I., CENTURION, J. F. Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27, 1999, Brasília. **Anais...** Brasília:SBCS, 1999. CD ROM.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analyses of the Association of Official analytical chemists. 13 ed. Washington. 1980. 1015p.

BALSALOBRE, M. A. A., NUSSIO, L. G., MARTHA Jr., G. B. Controle de perdas na produção de silagens de gramíneas tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:SBZ, 2001, p. 890-911.

CASTRO, F. G. Uso de pré-emurchecimento, inoculante bacteriano-enzimático ou ácido propiônico na produção de silagem de Tifton 85 (*Cynodon dactylon* ssp). Tese de Doutorado – ESALQ/USP, Piracicaba, 2002, 136p.

CATCHPOOLE, V. R., HENZEL, E. F. Silage and silage-making from tropical herbage species. **Herbage Abstracts**. v. 41, p. 213-221, 1971.

CHAMBERLAIN, D. G. The silage fermentation in relation to the utilization of nutrients in the rumen. **Process Biochemistry**, v. 1, p. 60-63, 1987.

CHERNEY, D. J. R. Characterization of forages by chemical analysis. In: FORAGE EVALUATION IN RUMINANT NUTRITION. New York:CABI Publishing, 2000, p. 281-300.

CORLETT Jr., D. A., BROWN, M. H. pH and acidity. In: **Microbial ecology of foods**. New York:Academic Press, 1980, p. 92-111.

COSTA, C., MONTEIRO, A. L. G., BERTO, D. A. et al. Impacto do uso de aditivos e/ou inoculantes comerciais na qualidade de conservação e no valor alimentício de silagens. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS. 1, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá:UEM, 2001, p. 87-126.

DODDS, K. L., AUSTIN, J. W. Foodborne pathogenic bacteria: *Clostridium botulinum*. In: FOOD MICROBIOLOGY: Fundamentals and frontiers. Washington:ASM Press, 1997, p. 288-304.

DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, W. H., VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculant with *Lactobacillus buchneri*, with or without mofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v. 56, p. 330-343, 2001.

EVANGELISTA, A. R., LIMA, J. A., SIQUEIRA, C. L., et al. Aditivos na ensilagem de Coast cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers) 1. Farelo de trigo e polpa cítrica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:SBZ, 2001. CD ROM.

HIGGINBOTHAM, G. E., MUELLER, S. C., BOLSEN, K. K., et al. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 2185-2192, 1998.

IGARASI, M. S. Controle de perdas na ensilagem de capim-Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. Cv. Tanzânia) sob os efeitos do teor de matéria seca, do tamanho de partícula, da estação do ano e da presença do inoculante bacteriano. Dissertação de Mestrado -ESALQ/USP, 2002, 132p.

JOHNSON, R. R., BALWANI, T. L., JOHNSON, L. J. et al. Corn plant maturity. II. Effect on *in vitro* cellulose digestibility and soluble carbohydrate content. **Journal Animal Science**, v. 25, p. 617-623, 1966.

JONSSON, A. Growth of clostridium tyrobutiricum during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. **Journal Science Food Agriculture**, v. 54, p. 557-568, 1991.

LICITRA, G., HERNANDEZ, T. M., VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science Technology**, v. 57, p. 347-358, 1996.

McDONALD, L. C., McFEETERS, R. F., DAESCHEL, M. A., et al. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1382-1384, 1987.

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

McGECHAN, M. B. A review of losses arising during conservation of grass forage: Storage losses. **Journal Agricultural Engineering Research**, v. 45, p. 1-30, 1989.

MONTVILLE, T. J. Principles which influence microbial growth, survival and death in foods. In: **FOOD MICROBIOLOGY: Fundamentals and frontiers**. Washington:ASM Press, 1997, p. 13-29.

NUSSIO, L. G., PAZIANI, S. F., NUSSIO, C. M. B. Ensilagem de capins tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39. 2002. Recife. **Anais...** Recife:SBZ, 2002, p. 60-99.

OSTLING, C., LINDGREN, S. Influences of enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silages. **Grass and Forage Science.**, v. 50, p. 41-47, 1995.

PEDREIRA, M. S., MOREIRA, A. L., REIS, R. A., et al. Características químicas e fermentativas do Tifton 85 (*Cynodon* spp.) ensilado com diferentes conteúdos de matéria seca e níveis de polpa cítrica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:SBZ, 2001. CD ROM.

PITT, R. E. **Silage and hay preservation**. Ithaca:Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1990. 53p. (NRAES-5).

PLAYNE, M. J., MCDONALD, P. The buffering constituents of herbage and of silage. **Journal of Science Food Agricultural**, v. 17, p. 264-268, 1966.

REIS, S. T. Valor nutricional de gramíneas tropicais em diferentes idades de corte. Dissertação de Mestrado – UFLA, 2000, 99p.

REIS, R. A., JOBIM, C. C. Perfil da fração de carboidratos da planta e adequação de aditivos no processo de ensilagem. In: Workshop sobre milho para silagem, 2. Piracicaba, 2001. **Anais...** Piracicaba:FEALQ, 2001, p.27-52.

RIBEIRO, K. G., PEREIRA, O. G., SOUZA, P. P. S., et al. Composição bromtológica de silagens de *Brachiaria decumbens*, tratadas com inoculante microbiano, em diferentes idades de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife:SBZ, 2002. CD ROM.

ROBERTSON, J. B., VAN SOEST, P. J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: THE ANALYSIS OF DIETARY FIBER IN FOOD. New York, 1981, p. 123-158.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2 ed. Viçosa:UFV, 1998, 166p.

SILVA, C. L. Perfil de fermentação das silagens de capim-Tanzânia com aditivos. Dissertação de mestrado – UFLA, 2002, 83p.

TILLEY, J. M. A., TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal British Grassland**, v. 18, p. 104-111, 1963.

TOSI, H., SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., RAVAZI, J. P. Presença de *Clostridium* em silagem de milho colhido em diferentes estágios de desenvolvimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, p. 1133-1136, 1982.

VAN SOEST, P. **Nutritional ecology of the ruminant**. New York, 1994. 476p.

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 Dairy Science**, v. 84, p. 2195-2202, 2001.

WINTERS, A. L., WHITTAKER, P. A., WILSON, R. K. Microscopic and chemical changes during the first 22 days in Italian ryegrass and cocksfoot silages made in laboratory silos. **Grass and Forage Science**, v. 42, p. 191-196, 1987.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York, 1984. 305p.

CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO DIÁRIA E TOTAL DE EFLUENTE DAS SILAGENS DE CAPIM-MARANDU ADICIONADAS DE POLPA CÍTRICA PELETIZADA

RESUMO

As perdas via efluente estão associadas principalmente com o alto teor de umidade da forragem, e a utilização de aditivos absorventes no momento da ensilagem pode evitar a produção do mesmo. O objetivo deste trabalho foi quantificar as perdas pela produção de efluente e analisar qual o potencial da polpa cítrica peletizada (PCP) em reduzir a sua produção. O experimento foi conduzido nas dependências do Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP, utilizando o capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A. Rich) Stapf cv. Marandu) estabelecido em um Latossolo Vermelho Eutrófico típico textura muito argilosa a moderado caulítico-oxítico mesoférico e colhido com 58 dias de crescimento. Foram utilizados silos experimentais de PVC adaptados com uma tubulação por onde ocorreu o escoamento do líquido produzido, onde a forragem foi compactada para atingir densidade de 900 kg/m³. Os tratamentos constituíram-se de três quantidades de PCP (0, 5, 10% com base na matéria natural) e cinco tempos de coleta do efluente. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro repetições, utilizando o esquema de parcelas subdivididas, sendo o fator das parcelas os tratamentos e o fator atribuído a subparcela o tempo. O alto conteúdo de umidade da forragem propiciou elevada quantidade de efluente, principalmente durante os dois primeiros dias de ensilagem. A presença da PCP reduziu de maneira significativa a produção de efluente, mostrando-se eficiente na redução das perdas. As equações propostas por Sutter (1957) e Haigh (1999) com base no conteúdo de matéria seca da forragem, subestimaram a produção de efluente das silagens produzidas. Sendo que o efeito da alta compactação alcançada ficou evidenciado em relação as perdas ocasionadas durante a fermentação.

Palavras-chave: ensilagem, perdas, aditivo, fermentação

INTRODUÇÃO

A origem das perdas de um alimento ensilado está relacionada com a respiração residual, fermentação, produção de efluente no silo e durante a secagem no campo, fermentação secundária, deterioração aeróbia durante a secagem e após a abertura do silo. Essas perdas em conjunto podem alcançar de 7 a 40% e aquelas envolvidas com a produção de efluentes podem contribuir com 5 ou até mais de 7% do total (McDonald et al., 1991).

Segundo Nussio et al. (2002) as perdas por efluente representam decréscimo do valor nutricional da silagem e riscos de poluição ambiental. Quando o efluente é escoado para cursos d'água, as substâncias nele contidas são utilizadas por microrganismos e, durante o processo, parte ou todo oxigênio presente na água pode esgotar-se. A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) do efluente da silagem é excepcionalmente maior que a do esgoto doméstico, sendo considerado um sério poluente para os lençóis freáticos (Loures, 2000).

Woolford (1978) relatou que a DBO do efluente é de 90.000 mg O₂/L, enquanto que a DBO do esgoto doméstico é de 500 mg O₂/L. McDonald et al. (1991) verificaram na literatura que a demanda bioquímica de oxigênio varia de 40.000 a 90.000 mg O₂/L. Loures (2000) observou em silagens de capim elefante que a DBO do efluente foi de 14.597 mg O₂/L, sendo considerada abaixo dos valores encontrados na literatura. Porém, é considerada ainda muito alto e com grande potencial de poluição.

Segundo Nussio et al. (2002) as perdas por efluente podem ser evitadas utilizando forragens naturalmente secas; misturando culturas mais secas às mais úmidas no momento da ensilagem; usando aditivos absorventes ou adotando o pré-emurchecimento na ensilagem.

Woolford (1978) relatou que o volume de efluente produzido em um silo é influenciado, principalmente, pelo conteúdo de matéria seca da espécie forrageira ensilada e o grau de compactação, além de outros fatores, tais como: tipo de silo, pré-tratamento mecânico da forragem, dinâmica de fermentação e fertilização do solo.

Na Grã Bretanha, a principal fonte de poluição vinda da agricultura é relativa ao efluente produzido pela ensilagem de gramíneas. No Brasil, pouco se tem feito para avaliar os aspectos quantitativos das perdas por efluente durante a ensilagem. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo quantificar as perdas pela produção de efluente e analisar qual o potencial da polpa cítrica peletizada (PCP) em reduzir a sua produção

MATERIAL E MÉTODOS

Localização e clima

O experimento foi conduzido nas dependências da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP.

A FCAV/UNESP está situada no município paulista de Jaboticabal, a 21° 15' 22" de latitude sul e 48° 18' 58" de longitude oeste de Greenwich e a uma altitude de 595 metros.

O clima é classificado como Cwa – mesotérmico de inverno seco, pelo sistema internacional de Koppen. Sendo assim, apresenta temperatura média anual máxima de 22,3 °C e mínima de 15,2 °C, no mês mais frio. A precipitação pluvial média é de aproximadamente 1400 mm, com 85% das chuvas concentradas nos meses de outubro a março.

Corte e colheita da forragem

O capim-Marandu foi colhido em uma área pertencente a FCAV/UNESP, estabelecido em um Latossolo Vermelho Eutrófico típico textura muito argilosa a moderado caulítico-oxítico mesoférico de relevo suave ondulado (Andrioli e Centurion, 1999), cuja análise química foi realizada no mês de Agosto de 2001 e a composição está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química do solo da área experimental

pH em CaCl ₂	MO g/dm ³	P resina mg/dm ³	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H ⁺ + Al ³⁺	SB	V
						mmol _c /dm ³	%	
5,5	28	24	4,3	26	15	30	45	59

Fonte: Laboratório de análise do solo – FCAV/UNESP

MO: matéria orgânica; SB: soma de bases; V: saturação por bases

Profundidade 0-20 cm

Anteriormente, a área havia sido fertilizada com 150 kg/ha de uréia no mês de Novembro de 2001 quando foi realizada uma colheita para produção de silagem. Para tanto foi efetuada uma nova aplicação de 150 kg/ha de uréia durante o mês de Janeiro de 2002, logo após o corte de rebaixamento da forragem.

A colheita foi realizada no dia 25 de Março de 2002, quando o capim apresentava 58 dias de crescimento vegetativo (Tabela 2), utilizando-se colhedora marca JF modelo Z10, regulada para que o corte fosse realizado a 15 cm do solo, obtendo-se tamanhos de partícula entre 2 a 5 cm. Deve-se destacar que este equipamento normalmente é empregado para colheita de culturas como milho e sorgo, devido a este fato, foram obtidos tamanhos de partícula inferiores aos das colhedoras utilizadas para o corte de capins tropicais.

Tabela 2. Características da forrageira no momento da ensilagem

Parâmetros	
Idade (dias)	58
Altura (cm)	105
Massa de forragem (t MS/ha)*	7,1
Folha (%)*	54
Caule (%)	46

* Corte realizado a 15 cm do solo

Preparo das silagens e coleta de efluente

A forragem colhida foi submetida aos seguintes tratamentos: ensilagem do capim-Marandu diretamente após o corte; ensilagem do capim-Marandu + 5% de polpa cítrica peletizada (PCP) e ensilagem do capim-Marandu + 10% de PCP com base na matéria natural.

Nos tratamentos com polpa cítrica peletizada, a sua adição ocorreu no momento anterior ao enchimento dos silos, efetuando-se perfeita homogeneização com a forragem colhida diretamente após o corte.

Para confecção dos silos experimentais, foram utilizados canos de PVC com 50cm de altura e 10cm de diâmetro, com tampas de PVC apropriadas para garantir a vedação adequada. Em sua parte inferior, foi adaptado uma tubulação por onde ocorreu o escoamento do líquido produzido. Na extremidade de cada silo, foi confeccionada uma válvula para escape dos gases produzidos.

A forragem foi compactada por meio de bastões de ferro, com acomodação de camadas de aproximadamente 10 cm de espessura, atingindo uma densidade de 900 kg/m³. Com a acomodação final da forragem, os silos foram fechados e esses foram armazenados em local protegido, mantido a temperatura ambiente.

Durante os cinco primeiros dias, o volume de efluente foi coletado duas vezes ao dia, uma pela manhã e outra no final da tarde. O volume de efluente de cada silo foi medido com auxílio de uma proveta, e logo após, armazenado em freezer.

Após o quinto dia de coleta não foram observadas produções de efluente, e então as tubulações de escoamento foram vedadas.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, utilizando o esquema de parcelas subdivididas, sendo o fator das parcelas os tratamentos e o fator atribuído a subparcela o tempo. Os dados foram analisados utilizando o programa de Análise Estatística ESTAT, desenvolvido pelo departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, pelos procedimentos da análise de variância sendo que para comparação entre médias empregou-se o teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Além do teor de umidade do material ensilado, a compactação da massa influencia diretamente sobre a quantidade de efluente produzida. Outros fatores também contribuem de forma indireta na produção de efluente como, por exemplo, a profundidade e largura do silo.

Os valores de produção de efluente das respectivas silagens estão apresentados na Tabela 3. Verifica-se que houve significância ($P < 0,05$) para o efeito de tempo de ensilagem e alteração do teor de matéria seca da silagem, sob a produção de efluente. Contudo, a partir do terceiro dia de ensilagem não foi observada significância ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Observa-se que mais de 80, 75 e 30% do total do efluente foram produzidos no primeiro dia de ensilagem, para as silagens com 0, 5 e 10% de PCP, respectivamente.

Avaliando silagens de capim elefante com alto teor de umidade (13% de MS), submetidas a diferentes densidades de compactação (356 a 791 kg/m³), Loures (2000) observou que 55% da produção de efluente aconteceu nos dois primeiros dias de ensilagem, em todas as compactações.

Fisher et al. (1981) citado por Igarasi (2002) analisaram a produção de efluente de silagens de gramíneas ensiladas com alta umidade, e constataram que 75% do efluente foi produzido durante os primeiros cinco dias após a ensilagem.

Segundo Woolford (1984) o esgotamento da disponibilidade de oxigênio do material ensilado contribui para ruptura da membrana celular da planta, facilitando a perda de água da célula. Neste sentido, a elevada produção de efluente no primeiro dia de ensilagem pode ser devida a integridade da membrana celular, cujo comportamento do efluente pode ser acompanhado de forma similar. Para esse autor, quando a fermentação afeta a membrana celular da planta, a produção de efluente ocorre nos primeiros estágios da ensilagem, conforme observado no presente trabalho. Outro fator relacionado a este fato é a elevada compactação exercida durante a ensilagem (900 kg/m³) pois, segundo Gordon (1967) o excesso

de água e a seiva das células da forragem são extraídos pela compactação e percolam como efluente através do material ensilado.

A existência de uma relação entre pressão aplicada e a produção de efluente é sustentada por vários resultados experimentais (Woolford, 1978). Jones e Jones (1995), constataram, em uma série de experimentos com prensa hidráulica, que a produção de efluente aumentava com a pressão aplicada a silagem.

Tabela 3. Produção diária e total de efluente (L/t de silagem) associado à adição de polpa cítrica peletizada em silagens de capim-Marandu

Silagens (%PCP)	Dias					Média	CV (%)	Total
	1	2	3	4	5			
0	87,7 ^{Aa}	7,7 ^{Ab}	6,8 ^{Abc}	4,1 ^{Abc}	3,0 ^{Ac}	21,9 ^A	10,1	109,3 ^A
5	54,0 ^{Ba}	4,3 ^{ABbc}	7,3 ^{Ab}	3,3 ^{Abc}	2,7 ^{Ac}	14,3 ^B	-	71,7 ^B
10	5,2 ^{Ca}	2,8 ^{Ba}	5,1 ^{Aa}	2,9 ^{Aa}	1,3 ^{Aa}	3,5 ^C	-	17,5 ^C
Média	48,9 ^a	5,0 ^{bc}	6,4 ^b	3,4 ^{cd}	2,3 ^d	-	-	-
CV (%)	16,4	-	-	-	-	-	-	5,0

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05)

CV: coeficiente de variação

A forma geométrica e o tamanho do silo também exercem grande influencia sobre o tempo e a quantidade de escoamento do efluente. Zimmer (1964) citado por Woolford (1984) encontrou maior fluxo em silos do tipo torre, em relação aos de trincheira. No presente experimento, os silos são similares ao tipo torre e também possuem pequeno tamanho, razão pela qual houve contribuição para o grande escoamento de líquido durante os primeiros dias de ensilagem.

Pela análise dos dados da Tabela 3, pode-se inferir que conforme o teor de matéria seca é elevado, pela adição de PCP, a produção de efluente decresce (P<0,05). Tais resultados condizem com os dados obtidos por Aguiar et al. (2001), que incluíram três níveis de PCP (0, 5 e 10%) na massa ensilada e constataram a diminuição da produção de efluente. Fransen e Strubi (1998) também mencionaram o efeito da menor produção de efluente pela adição de aditivos absorventes que promoveram a elevação do teor de matéria seca da forragem.

O efeito do teor de umidade na produção de efluente é amplamente citado na literatura, sendo que diversos autores estudaram leguminosas e gramíneas, e obtiveram diminuição na produção à medida que o teor de matéria seca aumentou (Jones et al., 1990; Reynolds e Willians, 1995; Jones e Jones, 1995; Fransen e Strubi, 1998; Haigh, 1999 e Igarasi, 2002).

A adição de 5% e 10% de PCP reduziu em 35 e 85% a produção total de efluente, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle. A polpa cítrica peletizada possui alto poder higroscópico, podendo elevar o seu peso em 145% quando em contato com forragens úmidas (Vilela, 1998).

Segundo Nussio et al. (2002) silagens de capim-Tanzânia colhido sob três tamanhos de partícula, com adição de 10% de PCP ou pré-emurhecida, apresentaram reduções nas perdas por efluente em relação às silagens controle. Entretanto, as reduções foram maiores para o tratamento pré-emurhecido comparativamente à adição PCP, sugerindo que mesmo sob teor de MS semelhante, a atividade e provável localização de água na célula vegetal são responsáveis por parte da carga de efluente gerada na massa.

Pelo fato da produção de efluente ser diretamente proporcional ao conteúdo de umidade da forragem ensilada, diversos autores propuseram algumas equações de regressão, tendo como objetivo estimar a quantidade de efluente produzido, em função do teor de matéria seca presente na forragem.

Sutter (1957) citado por Woolford (1984) propôs uma equação na qual o volume de efluente produzido pode ser obtido através do conhecimento do conteúdo de matéria seca da cultura no início da ensilagem pela fórmula: $V: 669,4 - 2,24MS$. Haigh (1999) usou a seguinte equação: $V: 12.983 - 0,051MS$, onde nas duas equações o volume de efluente é expresso em L/t de silagem, e o conteúdo de matéria seca em g/kg.

Na Tabela 4, encontram-se os dados obtidos para a produção de efluente, estimados através das duas equações. Observa-se que a fórmula proposta por Sutter superestimou a produção de efluente para as silagem controle, e subestimou para as demais silagens. Por outro lado a fórmula propostas por Haigh

(1999) subestimou a produção de efluente para todas as silagens, se for fixado o conteúdo de matéria seca da silagem.

As silagens com 0, 5 e 10% de polpa cítrica apresentaram em média 24,1 27,0 e 30,2% de matéria seca no momento da ensilagem, respectivamente. De acordo com a equação de Sutter, valores de MS próximos a 29,8% seriam necessários para eliminar a produção de efluente, enquanto que a equação de Haigh (1999) estima valores de 25,4% de MS para que a produção de efluente seja nula.

Tabela 4. Produção de efluente (L/t silagem) observada durante cinco dias de coleta e produção estimada através das equações propostas por Sutter (1957) e Haigh (1999) para silagens com diferentes proporções de polpa cítrica peletizada

Produção de efluente			
Silagens (% PCP)	Observada	Estimada	
		Sutter (1957)	Haigh (1999)
0	109,3	131,8	0,7
5	71,7	64,6	-0,8
10	17,5	-2,6	-2,3

Isto indica que outros parâmetros devem estar correlacionados com as perdas por efluente e não somente o teor de matéria seca. Segundo Nussio et al. (2002) com a intensificação da compactação para obter-se maior densidade da massa ensilada, haveria maior chance de aumentos na produção de efluente, sendo que este efeito depende do teor de matéria seca da planta ensilada.

CONCLUSÕES

Na ensilagem de capim-Marandu com baixo teor de matéria seca ocorreu elevada produção de efluente cuja produção foi verificada durante os primeiros dias de ensilagem.

A presença de 10% de polpa cítrica peletizada reduziu em 85% a produção total de efluente, evidenciando o seu grande poder absorvente.

As equações propostas para estimarem a quantidade de efluente produzido não se mostraram adequadas nesse estudo, havendo uma subestimação dos resultados, possivelmente por não considerarem o efeito da compactação e a presença da polpa cítrica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R. N. S., CRESTANA, R. F., BALSALOBRE, M. A. A., et al. Efeito do tamanho de partícula na composição da fração nitrogenada de silagem de capim-Tanzânia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:SBZ, 2000. CD ROM.

ANDRIOLI, I., CENTURION, J. F. Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27, 1999, Brasília. **Anais...** Brasília:SBCS, 1999. CD ROM.

FRANSEN, S. C., STRUBI, F. J. Relationships among absorbents on the reduction of grass silage effluent and silage quality. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2633-2644, 1998.

GORDON, C. H. Storage losses in silage affected by moisture content and structure. **Journal of Dairy Science**, v. 50, p. 397-403, 1967.

HAIGH, P. M. Effluent production from grass silages treated with additives and made in large-scale bunker silos. **Grass and Forage Science**, v. 54, p. 208-218, 1999.

IGARASI, M. S. Controle de perdas na ensilagem de capim-Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. Cv. Tanzânia) sob os efeitos do teor de matéria seca, do tamanho de partícula, da estação do ano e da presença do inoculante bacteriano. Dissertação de Mestrado -ESALQ/USP, 2002, 132p.

JONES, D. I. H., JONES, R. The effect of crop characteristics and ensiling methodology on grass silage effluent production. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 60, p. 73-81, 1995.

JONES, D. I. H., JONES, R., MOSELEY, G. Effect of incorporating rolled barley in autumn-cut ryegrass silage on effluent production, silage fermentation and cattle performance. **Journal of Agricultural Science**, v. 115, p. 399-408, 1990.

LOURES, D. R. S. Características do efluente e composição químico-bromatológica da silagem sob níveis de compactação e de umidade do capim-Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum cv. Cameroon). Dissertação de mestrado, UFV, 2000, 66p.

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

NUSSIO, L. G., PAZIANI, S. F., NUSSIO, C. M. B. Ensilagem de capins tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39. 2002. Recife. **Anais...** Recife:SBZ, 2002, p. 60-99.

REYNOLDS, A. M., WILLIAMS, A. G. A model of silage consolidation and effluent flow. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 61, p. 173-182, 1995.

VILELA, D. Aditivos para silagens de plantas de clima tropical. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES E NÃO-RUMINANTES, Botucatu, 1998. **Anais**. Botucatu:SBZ, 1998. P. 73-108.

WOOLFORD, M. K. The problem of silage effluent. **Herbage Abstracts**, v. 48, p. 397-403, 1978.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York, 1984. 305p.

CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E ESTABILIDADE AERÓBIA DAS SILAGENS DE CAPIM-MARANDU ADICIONADAS DE POLPA CÍTRICA PELETIZADA

RESUMO

A exposição da silagem ao ar, acompanhada por perdas no valor nutritivo se constitui num dos principais problemas durante a ensilagem, e muito tem-se estudado nos últimos anos para evita-la. Essa pesquisa teve como objetivo caracterizar a população microbiana e avaliar a estabilidade aeróbia das silagens de capim-Marandu na presença de polpa cítrica peletizada (PCP). O experimento foi conduzido nas dependências do Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP, utilizando o capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A. Rich) Stapf cv. Marandu) estabelecido em um Latossolo Vermelho Eutrófico típico textura muito argilosa a moderado caulítico-oxítico mesoférrico e colhido com 55 dias de crescimento. A forragem colhida foi submetida aos seguintes tratamentos: ensilagem do capim-Marandu diretamente após o corte; ensilagem do capim-Marandu + 5% de polpa cítrica peletizada (PCP) e ensilagem do capim-Marandu + 10% de PCP com base na matéria natural. Durante o ensaio de dinâmica microbiológica e alteração química das silagens em aerobiose foram utilizados como silos, tambores de metal medindo 80 cm de altura por 50 cm de diâmetro, com densidade de 900 kg/m³. Sendo que as determinações foram feitas com 0, 2, 4 e 6 dias após a abertura. Na avaliação da estabilidade aeróbia através da alteração da temperatura, aproximadamente três quilos de silagem foram colocados em caixas de isopor e estas foram armazenadas em câmara climática (25°C) durante sete dias. Para os dois ensaios o delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com cinco repetições, utilizando o esquema de parcelas subdivididas, sendo o fator das parcelas os tratamentos e o fator atribuído a subparcela o tempo. As silagens de capim-Marandu com 0% de PCP apresentaram desenvolvimento de bacilos e enterobactérias, havendo também elevação nos valores de pH e N-NH₃ com o decorrer do desabastecimento dos

silos. A presença de leveduras foi detectada nas silagens que receberam o aditivo, sendo que a população elevou-se do primeiro para o sexto dia de aeração. Os valores da PB, da fração B3 e da DIVMS foram reduzidos a medida que os tempos de aeração avançaram. Com o prolongamento da exposição aeróbia a tendência de elevação de temperatura foi detectada principalmente nas silagens com 10% de PCP. As cepas de leveduras isoladas apresentaram assimilação de lactato, caracterizando as silagens como sujeitas a rápida deterioração. Com a abertura dos silos, as silagens apresentaram-se instáveis seja pelo desenvolvimento de bactérias ou de leveduras reduzindo o seu valor nutritivo.

Palavras chave: **ensilagem, microbiologia, aditivo, perdas**

INTRODUÇÃO

Quando efetua-se a abertura de um silo, o ambiente anaeróbio responsável pela conservação da forragem passa a ser aeróbio. Nessas condições, os organismos que estavam em dormência na ausência de oxigênio multiplicam-se rapidamente, promovendo a deterioração da silagem. Na prática, esse fenômeno manifesta-se por meio do desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (bactérias e fungos), elevação da temperatura e queda dos teores de proteína e de carboidratos do alimento.

Na ensilagem de capins tropicais a utilização de aditivos estimulantes da fermentação, como a polpa cítrica, tem provocado a ocorrência de fungos leveduriformes e filamentosos. Algumas silagens bem fermentadas, confeccionadas com aditivos e apresentando altos teores de ácido láctico e açúcares remanescentes parecem estar sujeitas a rápida deterioração por esses microrganismos. O provável motivo da instabilidade de silagens aditivadas está relacionado ao maior teor de fontes de energia para esses microrganismos envolvidos na degradação aeróbia (Kung Jr., 2001).

Durante a fermentação, os processos de degradação dos carboidratos estruturais e dos não estruturais e a avaliação dos fatores que afetam a

disponibilidade destas frações para o metabolismo dos microrganismos no silo devem ser considerados. A pectina difere dos outros carboidratos não estruturais quanto a seu destino durante a ensilagem. Quando ensilados, a maioria dos açúcares provenientes dos carboidratos não estruturais são fermentados. Entretanto, em estudos com silagem de alfafa aproximadamente 90% dos ácidos urônicos pécticos permaneceram não fermentados após 90 dias (Ben-Ghedalia et al., 1991). Como consequência da menor capacidade das bactérias lácticas em aproveitar este carboidrato, o uso da polpa cítrica na ensilagem tornaria as silagens mais susceptíveis a deterioração aeróbia por fungos.

Esses microrganismos são capazes de utilizar como fonte de energia carboidratos complexos, como amido, pectina, hemicelulose e celulose e tem a capacidade de degradar estes compostos em açúcares simples. Segundo Blanco et al. (1999) alguns gêneros de leveduras possuem a enzima poligalacturonase e são capazes de hidrolizar substâncias pécticas utilizando esses produtos como fonte de carbono para o seu metabolismo. Castilho et al. (2000) relataram que os fungos filamentosos excretam extensa quantidade de enzimas e que, algumas espécies de *Aspergillus* possuem a enzima pectinase.

A deterioração aeróbia da silagem está associada principalmente com o desenvolvimento de bactérias aeróbias, de fungos e de leveduras. Segundo Woolford (1990) o processo inicia-se com as leveduras que transformam os açúcares em dióxido de carbono. Esses organismos muitas vezes revelam-se resistentes a condições adversas, como por exemplo: temperaturas elevadas; concentração de substrato; velocidade de crescimento; tempo de fermentação e pH.

Assim, evidencia-se a importância e a necessidade de se realizar estudos objetivando isolar e caracterizar quais os microrganismos envolvidos no processo de degradação da silagem após a sua abertura.

Os principais critérios fisiológicos empregados na classificação de leveduras são a assimilação e a fermentação de determinados nutrientes. A descrição de suas espécies incluem a capacidade de fermentarem certos açúcares, sendo

normalmente testados: a glicose, a galactose, a sacarose, a maltose, a lactose e a rafinose. Fontes alternativas de carbono, como a xilose, a arabinose, o lactato e a pectina também podem ser testadas.

Segundo van der Walt e Yarrow (1984) as leveduras variam em sua habilidade para fermentarem açúcares, por exemplo, os gêneros *Torulospora*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* são caracterizados por apresentarem fermentação vigorosa da glicose, enquanto outros gêneros como *Hansenula* apresentam espécies fermentativas e não fermentativas.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar a população microbiana e avaliar a estabilidade aeróbia das silagens de capim-Marandu na presença de polpa cítrica peletizada.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização e clima

O experimento foi conduzido nas dependências da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP.

A FCAV/UNESP está situada no município paulista de Jaboticabal, a 21° 15' 22" de latitude sul e 48° 18' 58" de longitude oeste de Greenwich e a uma altitude de 595 metros.

O clima é classificado como Cwa – mesotérmico de inverno seco, pelo sistema internacional de Koppen. Sendo assim, apresenta temperatura média anual máxima de 22,3°C e mínima de 15,17°C no mês mais frio. A precipitação pluvial média é de aproximadamente 1400 mm, com 85% das chuvas concentradas nos meses de outubro a março.

Corte e colheita da forragem

O trabalho foi desenvolvido em uma área pertencente a FCAV/UNESP-Jaboticabal, cujo solo da área experimental foi classificado como Latossolo Vermelho Eutrófico típico textura muito argilosa a moderado caulítico-oxítico

mesoférico de relevo suave ondulado (Andrioli e Centurion, 1999) submetido a análise química no mês de Agosto de 2001, e sua composição é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química do solo da área experimental

pH em CaCl ₂	MO g/dm ³	P resina mg/dm ³	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H ⁺ + Al ³⁺	SB	V %
mmol _c /dm ³								
5,5	28	24	4,3	26	15	30	45	59

Fonte: Laboratório de análise do solo – FCAV/UNESP

MO: matéria orgânica; SB: soma de bases; V: saturação por bases

Profundidade 0-20 cm

Durante a adubação foi realizado somente o fornecimento de nitrogênio a fim de proporcionar um dossel com produtividade adequada ao nível de exploração proposto. Para tanto foi efetuada a aplicação de 150 kg/ha de uréia durante o mês de Novembro de 2001, logo após o corte de rebaixamento da forragem.

A colheita foi realizada no dia 17 de Janeiro de 2002 quando o capim apresentava 55 dias de crescimento vegetativo (Tabela 2) utilizando-se colhedora marca JF modelo Z10, regulada para que o corte fosse realizado a 15 cm do solo, obtendo-se tamanhos de partícula entre 2 a 5 cm. Deve-se destacar que este equipamento normalmente é empregado para colheita de culturas como milho e sorgo, devido a este fato, foram obtidos tamanhos de partícula inferiores aos das colhedoras utilizadas para o corte de capins tropicais.

Tabela 2. Características da forrageira no momento da ensilagem

Parâmetros	
Idade (dias)	55,0
Altura (cm)	110,0
Massa de forragem (t MS/ha)*	6,1
Folha (%)*	57,0
Caule (%)*	43,0

* Corte realizado a 15 cm do solo

Preparo das silagens

A forragem colhida foi submetida aos seguintes tratamentos: ensilagem do capim-Marandu diretamente após o corte; ensilagem do capim-Marandu + 5% de polpa cítrica peletizada (PCP) e ensilagem do capim-Marandu + 10% de PCP com base na matéria natural.

Nos tratamentos com adição de polpa cítrica peletizada, essa foi adicionada no momento anterior ao enchimento dos silos efetuando-se perfeita homogeneização com a forragem colhida diretamente após o corte.

Para confecção dos silos foram utilizados tambores de metal medindo 80 cm de altura por 50 cm de diâmetro. A forragem foi compactada por pisoteio humano, com acomodação de camadas de aproximadamente 20 cm de espessura atingindo densidade de 900 kg/m³. Com a acomodação final da forragem, os silos foram fechados com lona plástica e vedados com fitas plásticas adesivas e esses foram armazenados em local protegido e mantidos a temperatura ambiente.

Parâmetros avaliados

Decorridos 178 dias do fechamento, os silos foram abertos e para cada tratamento foram avaliadas a composição química e a dinâmica microbiológica das silagens através da contagem total de microrganismos nos seguintes tempos: 0, 2, 4 e 6 após a quebra da vedação. Assim, os silos foram manejados de modo que o tempo zero foi considerado o momento da abertura e a cada dois dias foi retirada uma fatia de ± 15 cm e então coletadas as amostras.

Imediatamente após a abertura dos silos, aproximadamente três quilos de silagem foram retirados dos silos e colocados em caixas de isopor com capacidade de sete litros que foram armazenadas em câmara climática a temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, para avaliação da estabilidade aeróbia. As temperaturas das silagens foram obtidas às 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a acomodação das caixas de isopor na câmara climática com o uso de termômetro inserido a 10 cm no centro da massa de silagem. A temperatura do ambiente foi controlada pelo termostato do aparelho refrigerador e também por meio de

termômetros suspensos no ar. A estabilidade aeróbia foi calculada como sendo o tempo observado para que o alimento, após a abertura do silo, apresente elevação em 1°C em relação à temperatura ambiente (Driehuis et al., 2001).

Análises químicas

As análises químicas da forragem e da silagem foram realizadas nos Laboratórios de Forragicultura e Nutrição Animal da FCAV/UNESP.

Com o decorrer do desabastecimento dos silos, as amostras foram coletadas e divididas em três frações. A primeira foi utilizada para determinação dos teores de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) conforme a AOAC (1980), as concentrações de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina pelo método seqüencial segundo as técnicas descritas por Robertson e Van Soest (1981). Para determinação da celulose foi utilizado o ácido sulfúrico a 72% (Van Soest, 1994). Adotou-se o método seqüencial de análise de fibra para que não houvesse a contaminação da pectina na FDA das amostras. Os teores de hemicelulose foram calculados por diferença entre FDN e FDA, e a lignina calculada por diferença entre FDA e celulose. A partir dos resíduos da FDN e FDA foram procedidas as análises de NFDN e NFDA. A determinação da fração B3 foi calculada pela diferença entre o N-FDN e N-FDA. A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi estimada utilizando-se a metodologia de Tilley e Terry (1963). A segunda porção foi levada para a prensa hidráulica para retirada do suco, o qual foi utilizado para determinar os teores de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) segundo AOAC (1980) e pH com o uso do potenciômetro Silva (1998). A terceira porção da amostra foi utilizada para as análises microbiológicas.

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas da silagem foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool da FCAV/UNESP.

O preparo das amostras para análise microbiológica consistiu de uma diluição prévia, pesando-se 25 g de silagem (matéria verde) e adicionando a 225 ml de solução salina estéril (8,5 g de NaCl/litro de água destilada). Após agitação foram retirados 10 ml do extrato para as diluições posteriores, e a partir dos extratos diluídos (10^{-1} a 10^{-5}) foram realizadas as sementeiras nos meios específicos para cada microrganismo estudado.

O desenvolvimento de bacilos foi avaliado conforme Speck (1976) utilizando-se o meio ágar nutriente (Difco) sendo que, as culturas foram incubadas em aerobiose a 30°C por três dias. Para determinar o desenvolvimento de enterobactérias nas silagens foi utilizado como meio de cultura Violet Red Bile Agar (Oxoid), com incubação aeróbia por três dias em temperatura de 35°C segundo Jonsson (1991). A contagem total de leveduras foi realizada conforme a metodologia descrita por Kurtman e Fell (1998). O meio de cultura utilizado foi o YN (Difco) acidificado com ácido láctico para obtenção de pH 4,0 sendo que, as amostras foram incubadas por 3 dias a 28°C. Também para contagem de fungos foi utilizado o mesmo meio de cultura e temperatura, sendo que a incubação foi realizada por 5 dias. A diferenciação entre leveduras e fungos foi realizada de acordo com a estrutura física das colônias sabendo-se que as leveduras são colônias unicelulares, enquanto que os fungos são multicelulares filamentosos.

Após a quantificação das leveduras, as colônias perceptivelmente distintas quanto a critérios morfológicos foram codificadas (Tabela 3) e inoculadas em tubos contendo o meio GYMP (Difco) inclinados e mantidos sob refrigeração passando a fazer parte da Coleção de Leveduras Selvagens do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool da FCAV/UNESP – Jaboticabal – SP.

Para realização deste estudo foram selecionadas seis cepas de leveduras selvagens codificadas como M01, M02, M03, M04, M05 e M06.

Tabela 3. Parâmetros morfológicos das colônias, empregados na avaliação das cepas isoladas

Parâmetros	Descrições
Tamanho	diâmetro (mm)
Textura	mucóide, viscosa, brilhante, fôska
Cor	branca, creme, rosa, vinho, etc.
Superfície	lisa, crespá, complexa
Bordo	liso, ondulado, denteado, filiforme, rizóide
Elevação	convexa, cônica, plana, elevada, gota, umbilicada

As culturas estocadas em tubos inclinados contendo meio de GYMP e mantidas sob refrigeração foram utilizadas para os seguintes testes segundo van der Walt e Yarrow (1984):

- Teste de assimilação de fontes de carbono em meio líquido, concentrado 10 vezes, testando as seguintes fontes de carbono: a glicose, a frutose, a xilose, a L-arabinose e o lactato;
- Teste para fermentação com as seguintes fontes: a glicose, a frutose, a xilose, a L-arabinose e o lactato.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições utilizando o esquema de parcelas subdivididas, sendo o fator das parcelas os tratamentos e o fator atribuído a subparcela o tempo. Os dados foram analisados utilizando o Programa de Análise Estatística ESTAT, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, pelos procedimentos da análise de variância sendo que para comparação entre médias empregou-se o teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dinâmica microbiológica

Dentre os microrganismos responsáveis pela deterioração aeróbia em silagens destacam-se os fungos filamentosos, as leveduras e as bactérias aeróbias. Segundo Woolford (1990) as bactérias proteolíticas (*Bacillus*) e as

produtores de ácido acético (*Acetobacter* e *Streptomyces*) colaboram para a instabilidade das silagens.

Na Tabela 4 encontram-se os dados referentes ao desenvolvimento de enterobactérias e bacilos. Constatou-se que a população de enterobactérias esteve presente nas silagens com 0% de PCP e aumentou após a abertura dos silos, porém esse comportamento não foi semelhante para as silagens com 5 e 10% de PCP. Possivelmente o pH médio (5,2) das silagens com 0% de PCP pode ter favorecido o crescimento deste grupo de microrganismos. Além deste fato, a redução da atividade de água (A_w) das silagens que receberam PCP, pode estar inibindo o desenvolvimento das enterobactérias, pois os microrganismos gram-negativos preferem ambientes com elevados valores de A_w (0,98).

Segundo Ostling e Lindgren (1995) durante a deterioração aeróbia das silagens, as enterobactérias tem oportunidade para reiniciar o crescimento de forma significativa. Lindgren et al. (1985) estudaram a deterioração aeróbia da silagem de gramíneas e gramíneas misturada com leguminosas e observaram que houve crescimento de enterobactérias após a exposição ao ar, sendo este mais intenso em temperatura ao redor de 30°C e na superfície dos silos em relação as amostras retiradas a 30 cm de profundidade. Segundo os autores as silagens coletadas na superfície dos silos apresentavam maiores valores de pH e menores teores de ácido lático, ambiente mais favorável a ocorrência dessas bactérias.

Jobim (1996) pesquisando o desenvolvimento de enterobactérias após a abertura do silo nas silagens de grãos úmidos e de espigas de milho, verificou que o maior tempo de aeração favoreceu o desenvolvimento dessas bactérias. O autor registrou 1,2; 1,5; 2,4; e 2,6 UFC/g de silagem nas silagens de grãos úmidos e 1,0; 2,3; 2,7 e 3,5 nas silagens de espiga, na abertura dos silos e a 2, 4 e 6 dias de aeração, respectivamente. Observa-se que estes valores são inferiores aos alcançados no presente estudo, evidenciando que as condições de alta umidade e baixa acidez das silagens de capim-Marandu sem aditivo podem levar ao rápido e alto desenvolvimento dessas espécies de bactérias.

O desenvolvimento de bacilos nas silagens apresentaram o mesmo comportamento verificado pelas enterobactérias (Tabela 4). Houve aumento no crescimento de bacilos com o decorrer do desabastecimento dos silos nas silagens com 0% de PCP, não sendo detectada a sua presença nos demais tratamentos. Esse fato pode ser oriundo também da influencia do pH sob o crescimento microbiano, já que os bacilos não toleram substratos moderadamente ácidos ($\text{pH} < 4,2$), característico das silagens aditivadas.

Woolford (1990) relatou que inicialmente acreditava-se que os bacilos apresentavam função secundária quando comparados as leveduras na deterioração de silagens. Porém, extensos estudos revelaram que esses microrganismos exercem uma função muito mais importante do que se acreditava para determinadas espécies forrageiras. Várias pesquisas realizadas na América do Norte e Europa tem mostrado que as bactérias do gênero *Bacillus* estão presentes nas silagens nas fases finais de deterioração, quando houve consumo de ácido láctico pelas leveduras e então o alimento apresenta elevado valor de pH. Entretanto, no ambiente tropical, no qual as forrageiras são caracterizadas por um processo de fermentação onde os valores de pH se estabilizam acima de 4,5, tem-se condições favoráveis ao desenvolvimento deste tipo de bactéria.

A presença de bacilos nas silagens provoca significativas alterações em sua composição química, principalmente em relação as proteínas, já que a maioria das espécies de bacilos são proteolíticos, como é o caso do *Bacillus cereus* (Granum, 1997) principal espécie envolvida na deterioração aeróbia. Segundo McDonald et al. (1991) a perda de aminoácidos em silagens, indicam a formação de compostos nitrogenados como as poliaminas. Phuntsok et al. (1998) estudaram as silagens de milho, sorgo, alfafa e trigo em relação as alterações no perfil de aminoácidos e verificaram aumento nas concentrações das poliaminas putrescina, cadaverina e espermidina e decréscimo nas concentrações de arginina, lisina e metionina. Segundo esses autores, a presença de poliaminas na silagem acarretam odor pútrico ao alimento, como foi observado no presente estudo nas silagens que apresentaram desenvolvimento de bacilos. Em geral a maioria dos

microrganismos utilizam compostos simples como os aminoácidos antes de ter que atacar compostos mais complexos, como as proteínas de alto peso molecular (Montville, 1997)

A recente revisão de Charmley (2001) relatou que os produtos da fermentação tem implicado na redução da ingestão quando culturas são ensiladas, e que em alguns estudos o declínio no consumo está associado principalmente com as frações nitrogenadas. Nussio et al. (2002) alertaram para o fato de que recentes trabalhos tem utilizado suplementação com aminoácidos específicos para suprir a falta de proteína no alimento, ao invés do fornecimento de suplemento com teor protéico elevado.

Tabela 4. Desenvolvimento de enterobactérias e bacilos (log UFC/g silagem) nas silagens de capim-Marandu submetidas a adição de polpa cítrica peletizada com o decorrer do desabastecimento dos silos

Silagens (% PCP)	Tempo (dias)			
	0	2	4	6
Enterobactérias				
0	3,9	4,0	4,1	4,5
5	-	-	-	-
10	-	-	-	-
Bacilos				
0	0,8	1,1	1,8	2,2
5	-	-	-	-
10	-	-	-	-

Segundo Woolford (1990) há um consenso em relação a importância de leveduras e fungos como agentes na deterioração das silagens pelo consumo de carboidratos estruturais e não estruturais.

Com relação ao desenvolvimento de leveduras (Tabela 5) pode-se verificar que as silagens com 5 e 10% de PCP apresentaram crescimento e este foi crescente com o decorrer do desabastecimento dos silos. Esse comportamento está condizente com a literatura, pois imediatamente após a oxigenação no interior do silo há intensa atividade de microrganismos aeróbios, principalmente leveduras, iniciando o processo de deterioração (Lindgren et al. 1985; Jobim,

1996; Guim, 1997; Ashbell et al. 2002). A população de leveduras pode aumentar acentuadamente de 2,0 log UFC/g de silagem para 12,0 log UFC/g de silagem em apenas três dias de aeração (Pitt et al. 1991). Silagens com populações de leveduras superior a 5,0 log UFC/g de silagem são altamente susceptíveis a deterioração (Woolford, 1990), portanto pode-se classificar as silagens avaliadas no presente estudo como não propensas a rápida deterioração, quando considera-se somente a o número de leveduras presente no alimento.

Tabela 5. Desenvolvimento de leveduras e fungos (log UFC/g silagem) nas silagens de capim-Marandu submetidas a adição de polpa cítrica peletizada com o decorrer do desabastecimento dos silos

Silagens (% PCP)	Tempo (dias)			
	0	2	4	6
Leveduras				
0	-	-	-	-
5	1,0	1,2	1,2	1,3
10	1,4	1,4	1,7	1,8
Fungos				
0	-	-	-	-
5	-	-	-	-
10	1,4	-	-	-

As silagens com 0% de PCP não apresentaram desenvolvimento de leveduras, esse fato pode ser justificado pela falta de substrato para os microrganismos, sendo que a presença de PCP pode garantir nutrientes para assimilação dos mesmos e consequentemente posterior crescimento, seja pelo maior teor de ácido láctico das silagens aditivadas ou pela presença de pectina. Walker (1998) e Blanco et al. (1999) relataram que as espécies de *Candida* e *Cryptococcus* são eficientes utilizadoras de substâncias pécticas no metabolismo celular como fonte de carbono, e segundo Woolford (1990) estes dois gêneros são os principais envolvidos no processo de deterioração aeróbia.

Outra justificativa pela ausência de leveduras nas silagens controle seria a presença de ácido acético e propiônico, produzidos durante o processo fermentativo e também após a quebra da vedação. Segundo Corlett Jr. e Brown (1980) os diferentes ácidos podem exercer efeito inibitório ou letal sobre a célula

microbiana, pois em condições ótimas de substrato e próximas à neutralidade, o pH interno da célula é aproximadamente 7,0. Porém, esse valor é bastante afetado pelas variações externas, com inibição microbiana sendo devida a concentração hidrogeniônica (H^+ livres) ou pela toxicidade do ácido não dissociado. Walker (1998) relatou que os ácidos orgânicos fracos (acético, propiônico), na forma não dissociada são facilmente solúveis na membrana celular da levedura, inibindo o microrganismo pela liberação de H^+ conforme o esquema a seguir (Figura 1):

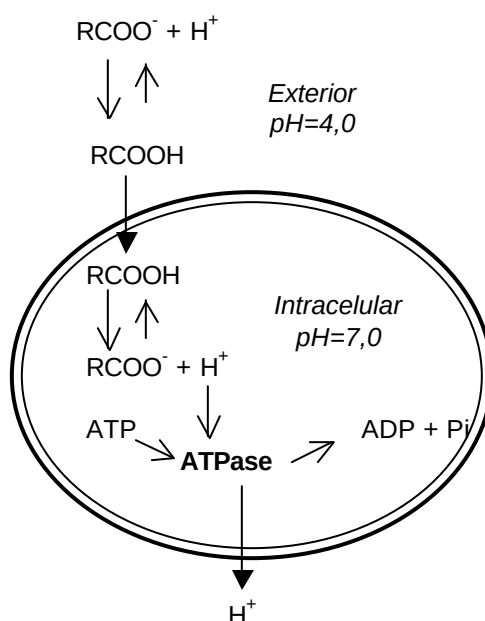


Figura 1. Destino do ácido orgânico em ambiente de baixo pH e na presença da célula microbiana

Adaptado de Davidson (1997)

Na tentativa de manter o pH interno adequado, as leveduras exportam H^+ acumulado dentro da célula através da enzima ATPase, utilizando energia neste processo, e este gasto energético acarreta uma redução no crescimento ou até morte da célula. Pois, a ATPase é a principal enzima presente na célula da

levedura, sendo responsável pelo controle do pH celular, nutrientes e transporte de íons (Walker, 1998).

Deve-se considerar que é nessa linha de pesquisa que os trabalhos dos últimos anos tem sido desenvolvidos em silagens com alto teor de nutrientes (Kung Jr. e Ranjit, 1998; Higginbotham et al., 1998; Driehuis et al. 2001 e Kung Jr. 2001). Esses pesquisadores tem avaliado bactérias como *Lactobacillus buchneri* e *Propionibacterium acidipropionici*, capazes de produzir durante o processo fermentativo não somente ácido láctico, mas também acetato e propionato pela rota heterolática de fermentação, e desse modo podem reduzir a presença de microrganismos que causam deterioração após a abertura do silo.

A falta de leveduras nas silagens que não receberam aditivo também pode ser explicada pela interação entre microrganismo-microrganismo. Segundo Woolford (1990) dentre as bactérias que se destacam durante a deterioração aeróbia encontram-se as do gênero *Streptomyces*. Walker (1998) relatou que a presença destas bactérias inibe o crescimento de leveduras, pois esses microrganismos produzem compostos como as cicloheximidas, letais a célula microbiana.

O desenvolvimento de fungos foi detectado somente na abertura dos silos nas silagens que continham 10% de PCP (1,4 log UFC/g silagem), como pode ser observado na Tabela 5. Pode-se inferir que esse comportamento foi verificado devido à presença de oxigênio na parte superior do silo, pois a dificuldade de compactação desta área durante a ensilagem favoreceu a oxigenação e, conseqüentemente o aparecimento de fungos.

Segundo Muck et al. (1991) os fungos tem crescimento mais lento que as leveduras, e normalmente apresentam menor população durante a armazenagem devido a sua maior sensibilidade a falta de oxigênio.

É interessante ressaltar que apesar de ter havido crescimento microbiano (enterobactérias, bacilos, leveduras e fungos), após a quebra da vedação, as populações encontradas estiveram abaixo das verificadas na literatura. Provavelmente, este fato ocorreu pelas baixas temperaturas observadas no período experimental (Tabela 6), pois os microrganismos possuem limites de

crescimento em relação a temperatura, cujos valores se encontram abaixo da faixa ideal considerada como ótimo rendimento celular para todos os grupos.

Tabela 6. Temperatura (°C) diária durante o período experimental

Dia	Temperatura		
	Máxima	Média	Mínima
15/07	27,5	17,4	9,2
16/07	29,4	18,3	10,2
17/07	27,7	17,8	11,0
18/07	25,7	17,3	10,0
19/07	28,2	19,3	12,0
20/07	29,3	21,7	15,3
21/07	22,3	18,2	16,9
22/07	20,4	17,0	14,8
Média do período	26,3	18,4	12,4

Fonte: Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas – FCAV/UNESP (2002)

Alterações químicas após a quebra da vedação

Após a exposição da silagem ao ar, o aumento de temperatura, queda no teor de carboidratos solúveis, baixa concentração de ácido lático e aumento no pH são importantes indicadores da deterioração da massa ensilada (Pitt et al. 1991 e Higginbotham et al. 1998).

Constatou-se, pela análise da Figura 2 que no momento da abertura dos silos, as silagens apresentavam diferentes valores de pH, sendo que, a presença de PCP determinou queda desses valores. Com o decorrer do desabastecimento dos silos, as silagens com 0 e 5% de PCP apresentaram elevação do pH ($P < 0,05$). O tratamento com 10% de PCP apresentou pequena queda após dois dias da quebra de vedação e nos demais tempos (4 e 6 dias) manteve-se estável. O aumento do pH nas silagens com 0 e 5% de PCP pode estar relacionado ao consumo de ácido lático pelos microrganismos deterioradores. Entretanto, o comportamento do pH apresentado pelas silagens com 10% de PCP não era esperado, haja visto que, essas silagens teoricamente possuem maiores teores de carboidratos e ácido lático para serem consumidos em relação as demais. Possivelmente, a alta densidade alcançada neste tratamento ($\pm 260 \text{ kg MS/m}^3$) tenha proporcionado pequena porosidade, o que dificultou a oxigenação da

silagem em camadas mais profundas do silo. Entretanto, o crescimento de leveduras, principal microrganismo deteriorador, tenha aumentado com o decorrer do desabastecimento dos silos (Tabela 5). Ashbell e Lisker (1988) estudando a deterioração aeróbia de silagens de milho em silos tipo “bunker” encontraram resultados semelhantes, sendo que nas camadas mais profundas o pH apresentou menores valores em relação a camada da superfície.

Guim (1997) utilizando o sistema PET para avaliação da deterioração de silagens de capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) por um período de oito dias de exposição, também verificou elevação dos valores de pH, passando de 3,9 na abertura para 5,8 no oitavo dia de aeração. Lindgren et al. (1985) trabalhando com silagens de gramínea em silos tipo “bunker”, encontraram 4,0 vs 6,4; 4,0 vs 4,5 e 4,0 vs 4,0 para as silagens no momento da abertura e após oito dias de exposição ao ar, nas camadas de 0-15 cm; 40-60 cm e 140-160 cm, respectivamente. Neste mesmo estudo, foi verificado que na camada mais profunda (140-160 cm) houve redução significativa na população de leveduras, bacilos e enterobactérias, mostrando a potencial alteração no alimento que esses microrganismos provocam.

Deve-se ressaltar que o consumo de ácido láctico pelos organismos que iniciam o processo de deterioração, além de promoverem nichos favoráveis aos microrganismos subsequentes, também provocam redução no valor nutricional do alimento. De acordo com Chamberlain (1987) dos produtos da fermentação o ácido láctico é melhor utilizado no ambiente ruminal. A bactéria ruminal *Megasphaera elsdenii* responsável pelo metabolismo do lactato produz 2 ATPs quando o ácido é fermentado, o que pode levar a uma contribuição para manutenção e crescimento de microrganismos, enquanto que o ácido acético e butírico não são aproveitados pelos microrganismos ruminais (Van Soest, 1994 e Russell e Rychlik, 2001).

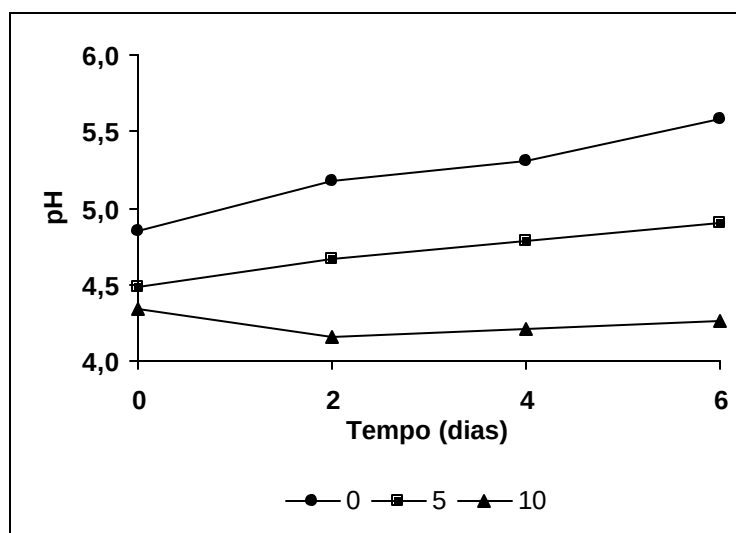


Figura 2. Valores de pH das silagens de capim Marandu submetidas a adição de 0, 5 e 10% de polpa cítrica peletizada com o decorrer do desabastecimento dos silos

Na Tabela 7 encontram-se os dados de PB e $N-NH_3$ referentes aos dias de desabastecimento dos silos. Observa-se que a presença de PCP aumentou os teores de PB das silagens ($P < 0,05$), sendo que as silagens que receberam o aditivo apresentaram maiores teores. Com a retirada da massa de silagem verifica-se que os tratamentos com 10% de PCP não sofreram alteração em seus teores, enquanto as silagens com 0 e 5% de PCP apresentaram decréscimo ($P < 0,05$) de PB com o decorrer do desabastecimento dos silos.

Esse comportamento ratifica os valores observados para os teores de $N-NH_3$. Pode-se observar que com a estabilidade da PB nas silagens com 10% de PCP, houve pequeno aumento dos teores de amônia. Entretanto, as silagens com 0 e 5% de PCP apresentaram elevado acréscimo ($P < 0,05$) nos teores de $N-NH_3$ com o decorrer do desabastecimento dos silos. Pode-se inferir que, as silagens com quantidades inferiores de PCP (0 e 5%) sofreram proteólise com o prolongamento do tempo de exposição ao ar, condizendo com os dados obtidos para o desenvolvimento de enterobactérias e bacilos que apresentaram amplo

crescimento, principalmente nas silagens com 0% de PCP após a quebra da vedação. Outro fator que também comprova a baixa estabilidade dessas silagens são os valores de pH, que sofreram pronunciado aumento após a abertura dos silos (Figura 2). Henderson et al. (1979) estudaram a estabilidade de silagens comerciais de gramíneas e concluíram que a alta concentração de N-NH_3 estava amplamente correlacionado com a instabilidade dessas culturas.

Tabela 7. Teores de proteína bruta (PB) e nitrogênio amoniacal (N-NH_3) das silagens de capim-Marandu submetidas a adição de polpa cítrica peletizada com o decorrer do desabastecimento dos silos

Tempo	Silagens			Média	CV (%)
	0	5	10		
	PB (% MS)				
0	7,9 ^{Ab}	9,1 ^{Aa}	9,0 ^{Aa}	8,7 ^A	5,2
2	6,9 ^{Bb}	8,9 ^{Aa}	9,0 ^{Aa}	8,3 ^{AB}	-
4	6,0 ^{Cb}	8,6 ^{ABa}	9,1 ^{Aa}	7,9 ^{BC}	-
6	5,7 ^{Cc}	8,0 ^{Bb}	9,3 ^{Aa}	7,7 ^C	-
Média	6,6 ^b	8,6 ^a	9,1 ^a	-	-
CV	5,7	-	-	-	-
	N-NH ₃ (% N total)				
0	22,8 ^{Ca}	13,9 ^{Bb}	8,8 ^{Bc}	15,2 ^C	9,9
2	24,5 ^{Ca}	14,2 ^{Bb}	8,1 ^{Bc}	15,6 ^C	-
4	34,9 ^{Ba}	17,1 ^{Bb}	10,9 ^{ABc}	24,3 ^B	-
6	37,9 ^{Aa}	24,9 ^{Ab}	12,9 ^{Ac}	31,9 ^A	-
Média	30,0 ^a	17,5 ^b	10,2 ^c	-	-
CV (%)	10,2	-	-	-	-

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

CV: coeficiente de variação

Pitt et al. (1991) desenvolveram um modelo com o intuito de avaliar a estabilidade aeróbia de silagens usando como parâmetros a temperatura, o pH, a concentração de carboidratos solúveis e outros, porém não incluíram a produção de amônia. Todavia, destacam que para determinadas culturas esse é um importante indicador de instabilidade do alimento.

A degradação da proteína na silagem determina nítido desbalanço entre nutrientes para os animais. Com o aumento das frações nitrogenadas solúveis (poliaminas e amônia), decorrentes da proteólise, ocorre desequilíbrio na relação proteína: energia das silagens, implicando em baixa produção de proteína

microbiana (Van Soest, 1994). Além dos efeitos nutricionais diretos, a presença desses compostos nitrogenados afeta negativamente o consumo pela ação na aceitabilidade das silagens (Charmley, 2001).

Os valores de N-FDN, N-FDA e fração B3 encontram-se na Tabela 8. Observa-se que os teores de N-FDN e a fração B3 sofreram pequeno acréscimo a medida que a PCP foi adicionada na ensilagem. Conforme os tempos foram prolongando-se as duas variáveis apresentaram queda nas silagens estudadas, caracterizando a participação da fração B3 durante o processo de proteólise após a abertura dos silos, em que pode ser observado aumento nos teores de N-NH_3 . Por esta razão, pode-se considerar que os microrganismos que participam da deterioração aeróbia das silagens também são capazes de utilizar essa fração como fonte de energia. Pois, segundo Igarasi (2002), Aguiar et al. (2001) e nesse estudo (Capítulo 2) a fração B3 pode ser utilizada como substrato para a proteólise durante o processo fermentativo.

Os teores de N-FDA apresentaram elevação com o decorrer do desabastecimento dos silos ($P < 0,05$). Esse comportamento pode ser justificado devido ao consumo parcial da fração B3 durante a aeração, já que os dados são expressos em percentagem. Segundo Van Soest (1994) a condensação de carboidratos com qualquer grupo amina livre em temperatura acima de 55°C formam polímeros que elevam os teores de nitrogênio ligado a fibra. O aquecimento das silagens pela deterioração dos microrganismos pode promover essas reações, influenciando os resultados de N-FDA. Porém, essa hipótese não é válida para o presente estudo, pois após a quebra da vedação foram registradas baixas temperaturas ambientais (Tabela 6) e essa refletindo-se no crescimento microbiano e consequentemente na temperatura da massa ensilada.

A respiração dos microrganismos aeróbios, influenciam na qualidade das silagens por utilizarem como substrato uma ampla variedade de nutrientes como os compostos solúveis e carboidratos estruturais pela ação fúngica (McDonald et al. 1991).

Tabela 8. Médias dos teores de nitrogênio ligado a fibra em detergente neutro (N-FDN), nitrogênio ligado a fibra em detergente ácido (N-FDA), fração nitrogenada B3, lignina e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) das silagens de capim-Marandu submetidas a adição de polpa cítrica peletizada com o decorrer do desabastecimento dos silos

Silagens (%PCP)	N-FDN*	N-FDA*	B3*	Lignina	DIVMS
0	44,6 ^B	20,4 ^A	24,2 ^B	5,2 ^A	42,3 ^C
5	44,9 ^B	20,0 ^A	25,0 ^B	4,5 ^B	54,7 ^B
10	46,5 ^A	16,8 ^B	29,2 ^A	3,4 ^C	63,1 ^A
CV (%)	3,7	2,9	36,1	15,7	3,7
Tempo (dias)					
0	45,4 ^A	18,2 ^B	29,2 ^A	4,5 ^A	55,1 ^A
2	45,9 ^{AB}	18,4 ^B	26,9 ^B	4,3 ^A	54,1 ^A
4	44,8 ^{BC}	19,4 ^{AB}	25,4 ^B	4,4 ^A	54,0 ^A
6	43,3 ^C	20,2 ^A	23,0 ^C	4,3 ^A	52,3 ^B
CV (%)	5,1	4,1	33,4	14,8	4,9

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05)

CV: coeficiente de variação

*% N total

Os valores de FDN, FDA, hemicelulose e celulose referentes aos tratamentos impostos as silagens estão apresentados na Tabela 9. A adição de PCP diminuiu os teores de FDN, FDA, hemicelulose e celulose (P<0,05) nas três silagens estudadas. Os teores de FDN e hemicelulose sofreram decréscimo com o decorrer do desabastecimento dos silos para as silagens que receberam 10% de PCP (P<0,05) e não foram alterados para as demais silagens. Provavelmente, as camadas mais profundas dos silos tiveram hidrólise da hemicelulose mais acentuada durante o processo fermentativo. A degradação deste carboidrato não pode ser atribuída aos fungos filamentosos, pois não foi observada presença deste grupo após o segundo dia de aeração. Com a retirada da massa de silagem detectou-se crescimento de leveduras, porém é pouco provável que estas espécies degradem carboidratos estruturais, a não ser algumas ramificações das cadeias de açúcares da hemicelulose.

Os teores de FDA e celulose apresentaram aumento com o prolongamento da aeração nas três silagens estudadas. Tal fato pode ser explicado pelo desaparecimento da hemicelulose, obtendo-se assim, elevação proporcional de FDA uma vez que essas análises são determinadas por método gravimétrico. Reis

e Jobim (2001) relataram que vários trabalhos conduzidos no Brasil evidenciaram queda dos teores de FDN e hemicelulose e elevação nos teores de FDA. Segundo os autores não houve síntese de parede celular, mas sim efeito de diluição desses constituintes.

Tabela 9. Teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose e celulose em porcentagem da matéria seca das silagens de capim-Marandu submetidas a adição de polpa cítrica peletizada com o decorrer do desabastecimento dos silos

Tempos (dias)	Silagens (% PCP)			Média	CV (%)
	0	5	10		
FDN					
0	76,5 ^{Aa}	65,5 ^{Ab}	56,3 ^{Ac}	66,1 ^A	3,2
2	75,8 ^{Aa}	65,5 ^{Ab}	56,4 ^{Ac}	65,9 ^A	-
4	77,0 ^{Aa}	65,8 ^{Ab}	54,9 ^{Abc}	65,9 ^A	-
6	76,0 ^{Aa}	65,6 ^{Ab}	52,5 ^{Bc}	65,4 ^A	-
Média	76,3 ^a	65,6 ^b	55,0 ^c	-	-
CV (%)	4,0	-	-	-	-
FDA					
0	46,2 ^{Aa}	38,7 ^{Bb}	32,1 ^{Bc}	39,0 ^B	4,2
2	45,6 ^{Ab}	39,7 ^{Bb}	31,4 ^{Bc}	38,9 ^B	-
4	46,0 ^{Aa}	41,4 ^{ABb}	35,3 ^{Ac}	40,9 ^A	-
6	46,7 ^{Aa}	42,8 ^{Ab}	37,8 ^{Ac}	42,4 ^A	-
Média	46,1 ^a	40,6 ^b	34,1 ^c	-	-
CV (%)	4,1	-	-	-	-
Hemicelulose					
0	30,3 ^{Aa}	26,8 ^{Ab}	23,9 ^{Ab}	27,0 ^A	8,9
2	30,2 ^{Aa}	25,8 ^{Ab}	24,6 ^{Ab}	26,9 ^A	-
4	31,0 ^{Aa}	24,4 ^{Ab}	19,6 ^{Bc}	25,0 ^{AB}	-
6	29,2 ^{Aa}	24,8 ^{Ab}	14,8 ^{Cc}	22,9 ^B	-
Média	30,2 ^a	25,5 ^b	20,7 ^c	-	-
CV (%)	9,4	-	-	-	-
Celulose					
0	40,9 ^{Aa}	34,0 ^{Cb}	28,5 ^{Bc}	34,5 ^B	4,6
2	40,4 ^{Aa}	35,2 ^{BCb}	28,2 ^{Bc}	34,6 ^B	-
4	40,7 ^{Aa}	37,1 ^{ABb}	31,8 ^{Ac}	36,5 ^A	-
6	41,8 ^{Aa}	38,4 ^{Ab}	34,2 ^{Ac}	38,2 ^A	-
Média	40,9 ^a	36,2 ^b	30,7 ^c	-	-
CV (%)	4,3	-	-	-	-

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05)

A DIVMS foi alterada pela adição de PCP (Tabela 8) obtendo maiores valores de digestão para as silagens que receberam o aditivo. Com o decorrer do

desabastecimento dos silos as silagens apresentaram decréscimo de digestibilidade ($P < 0,05$) evidenciando queda no valor nutritivo pela deterioração do alimento. Segundo McDonald et al. (1991) as perdas de energia pela deterioração aeróbia após a abertura do silo podem chegar acima de 15%. No presente estudo a DIVMS foi reduzida em 5%, do momento da abertura até o sexto dia de aeração, revelando o desabastecimento do silo como um importante dreno de nutrientes durante o processo de ensilagem. Nussio et al. (2002) relataram que deve-se considerar a instabilidade após a abertura do silo como uma forma adicional de perda de matéria seca e energia, e portanto deve-se adicioná-la às perdas inerentes ao sistema de produção.

É importante ressaltar que essas perdas poderiam ser maiores se a temperatura estivesse estimulado o crescimento microbiano durante a aerobiose, haja visto que durante o período experimental foram observadas baixas temperaturas. Este efeito pode ser comprovado pelo estudo de Igarasi (2002), na qual evidenciou-se que as silagens produzidas no inverno e exposta ao ar no verão (temperaturas altas) apresentaram menores taxas de recuperação de NDT do que as silagens produzidas no verão e submetidas a aeração durante o inverno.

Estabilidade aeróbia por meio da alteração da temperatura

No presente experimento o conceito de estabilidade aeróbia foi definido como sendo o tempo observado para que a massa de silagem, após a abertura do silo, apresente elevação em 1°C em relação a temperatura ambiente (Driehuis et al., 2001). Segundo Kung Jr (2001) os acúmulos de temperatura representam um maior aquecimento da massa ensilada, sendo reflexo da maior intensidade de reações promovidas pelos microrganismos oportunistas ao ambiente aeróbio.

Os resultados dos acúmulos de temperatura nos sete primeiros dias após abertura dos silos encontram-se na Tabela 10. Pode-se verificar que as três silagens em estudo foram estáveis de acordo com a metodologia imposta ao estudo, não ultrapassando em 1°C a temperatura ambiente (25°C). Entretanto,

verifica-se ao longo do prolongamento de exposição aeróbia a tendência de elevação de temperatura, principalmente no tratamento em que foi adicionado 10% de PCP. Esse fato pode ser devido a maior presença de nutrientes (ácido láctico e carboidratos) disponíveis aos microrganismos aeróbios, principalmente para as leveduras, conforme discutido anteriormente nesse capítulo. Pois, segundo Ashbell et al. (2002) os principais fatores que influenciam na estabilidade aeróbia da silagem são a presença de oxigênio, a presença de substrato e a temperatura em que o alimento está exposto.

Igarasi (2002) avaliou a estabilidade aeróbia das silagens de capim-Tanzânia pela temperatura acumulada durante 5 dias após a abertura dos silos, e verificou que o tratamento adicionado de PCP apresentou maior temperatura acumulada que a silagem controle, condizendo os dados obtidos pelo presente estudo. Balsalobre et al. (2001) relataram que as silagens de capim-Tanzânia picadas mais finamente e adicionadas de PCP caracterizaram sensível tendência de menor estabilidade aeróbia, quando comparado aos tratamentos de maior partícula e sem a presença de PCP.

Tabela 10. Elevação da temperatura e recuperação da matéria seca das silagens de capim-Marandu submetidas a adição de polpa cítrica peletizada

Tempo (dias)	Silagens (% PCP)			Média	CV (%)
	0	5	10		
0	19,7 ^{Ca}	19,9 ^{Aa}	19,9 ^{Ca}	19,8 ^D	1,32
1	19,3 ^{Cc}	21,5 ^{Ab}	22,3 ^{Ba}	21,0 ^{CD}	-
2	19,3 ^{Cc}	21,6 ^{Ab}	22,6 ^{Ba}	21,2 ^{CD}	-
3	20,4 ^{Bc}	21,9 ^{Ab}	23,0 ^{Aa}	21,8 ^C	-
4	20,6 ^{Bc}	21,5 ^{Ab}	23,0 ^{Aa}	21,8 ^C	-
5	20,8 ^{Bc}	21,6 ^{Ab}	23,7 ^{Aa}	22,0 ^{CB}	-
6	21,4 ^{Ac}	21,9 ^{Ab}	24,0 ^{Aa}	22,4 ^B	-
7	21,6 ^{Ab}	22,0 ^{Ab}	25,0 ^{Aa}	22,9 ^A	-
Média	20,4 ^c	21,4 ^b	23,0 ^a	-	-
CV (%)	1,89	-	-	-	-
MSR (%)	91,3 ^a	91,0 ^a	90,4 ^b	-	0,71

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05)

CV: coeficiente de variação; MSR: matéria seca recuperada

O fato das silagens com maiores teores de nutrientes serem menos estáveis pode ser comprovado pelos dados de matéria seca recuperada (MSR), onde as silagens que receberam 10% de PCP apresentaram valores inferiores de MSR, possivelmente devido a ação de leveduras que ao oxidarem os nutrientes da silagem produzem CO₂ causando perdas pela liberação de carbono (Tabela 10).

Ashbell et al (2002) pesquisaram durante três anos a estabilidade em aerobiose das silagens de milho e trigo, sob dois tempos de exposição ao ar (3 e 6 dias) e quatro temperaturas (10, 20, 30 e 40°C), e verificaram que o aumento de exposição ao ar e as temperaturas entre 20 e 30°C promoveram maiores perdas de CO₂ e conseqüentemente de nutrientes.

Caracterização preliminar das cepas de leveduras isoladas

Pode-se constatar na Tabela 11 que as leveduras isoladas apresentaram características variadas. Observa-se que houve pequena variação quanto ao tamanho das colônias (1 a 4 mm), todas possuíam superfície lisa e elevação convexa, diferindo nos parâmetros de textura, bordo e cor.

Convém citar que a estirpe M01 foi inoculada no meio de crescimento no primeiro dia de exposição aeróbia. As demais cepas foram inoculadas no segundo dia (M02), quarto dia (M03 e M04) e sexto dia (M05 e M06) após abertura dos silos. Nota-se que após o quarto dia de exposição aeróbia houve o aparecimento de novas cepas, caracterizando evolução no desenvolvimento das espécies.

Tabela 11. Aspectos morfológicos das colônias apresentados pelas cepas

Cepas	Tamanho	Textura	Superfície	Bordo	Elevação	Cor
M01	2-4 mm	brilhante	lisa	denteado	convexa	creme
M02	2-4 mm	brilhante	lisa	denteado	convexa	creme
M03	2-4 mm	brilhante	lisa	denteado	convexa	creme
M04	1-2 mm	fosca	lisa	liso	convexa	branca
M05	2-4 mm	brilhante	lisa	denteado	convexa	creme
M06	1-2 mm	fosca	lisa	liso	convexa	branca

De acordo com as características morfológicas apresentadas pelas leveduras verifica-se que, sob este aspecto, algumas cepas são diferentes pelo menos quanto ao aspecto visual. Este tipo de caracterização não é utilizado com a finalidade de diferenciação e classificação das leveduras, sendo empregado apenas para estudos de caracterização morfológica das colônias.

Os microrganismos de importância alimentícia, precisam para seu desenvolvimento e metabolismo os seguintes elementos: água, fonte de energia, fonte de nitrogênio, vitaminas e minerais (O'Leary, 1989).

A avaliação dos resultados apresentados pelas leveduras no teste de assimilação de fontes de carbono encontram-se na Tabela 12.

Nota-se que as diferentes cepas apresentaram resultados diversificados. As cepas M03, M04 e M06, além de apresentarem assimilação da glicose e da frutose, os dois carboidratos não estruturais mais abundantes nas plantas, também assimilaram a arabinose, a xilose e o lactato. As pentoses livres na forragem são poucas, mas podem aumentar a concentração pela ação das hemicelulases e hidrólise ácida durante o processo fermentativo. Segundo Van Soest (1994) a análise dos açúcares produzidos pelo processo de hidrólise da hemicelulose evidencia a presença de xilose e de arabinose. Prior e Kotter (1997) relataram que as pentoses são convertidas a xilose-5-fosfato, a qual pode ser transformada a acetilfosfato na produção de acetato ou gliceraldeído-3-fosfato quando ocorre a produção de etanol. Segundo Walker (1998) o metabolismo de pentoses nas leveduras, depende da espécie (presença de enzimas) e do "status" nutricional do organismo. Por exemplo, a presença de glicose geralmente reprime o efeito de assimilação de outros açúcares pelas leveduras.

Todas as cepas foram capazes de assimilar a glicose, a frutose e o lactato. Gancedo e Serrano (1989) relataram que o ácido láctico quando assimilado pela célula microbiana é oxidado a piruvato, induzido pela L-lactato:citocromo c oxiredutase, enzima que está localizada na membrana interna da mitocôndria das leveduras.

Tabela 12. Resultados apresentados pelas cepas quando inoculadas nos meios de assimilação de fontes de carbono

Estirpe	Fontes de carbono				
	Glicose	Frutose	Arabinose	Xilose	Lactato
M01	+	+	-	-	+
M02	+	+	-	-	+
M03	+	+	+	+	+
M04	+	+	+	+	+
M05	+	+	-	-	+
M06	+	+	+	+	+
Assimilação positiva (+); negativa (-)					

Segundo Woolford (1990) a população de leveduras que utilizam o lactato como fonte de energia determina se a silagem poderá ou não deteriorar-se com a exposição ao ar. Dessa forma, uma alta população não significa necessariamente que haverá uma rápida deterioração do alimento. Lindgren et al. (1985) registraram que durante a exposição aeróbia das silagens de gramíneas de clima temperado foram detectadas sete espécies de leveduras, sendo que *Candida lambica*, *Candida krusei* e *Hansenula anomala* apresentaram assimilação de ácido láctico durante os testes laboratoriais. Woolford et al. (2001) relataram que dos microrganismos aeróbios presentes na silagem durante a deterioração, os gêneros de leveduras *Hansenula* e *Candida* são os de maior importância, pelo fato de apresentarem assimilação de lactato.

Os dados referentes aos testes de fermentação encontram-se na Tabela 13. De acordo com os resultados obtidos, pelas cepas envolvidas nesta pesquisa, verificou-se que nenhuma delas foram capazes de fermentar a arabinose, a xilose e o lactato. Ocorrendo somente a fermentação da glicose e da frutose, porém foi caracterizada como fraca. Segundo Walker (1998) a fermentação é regulada por

vários fatores que incluem: síntese de enzimas, expressão de genes, atividade das enzimas e localização das organelas na célula. Isto determina a capacidade e o potencial de fermentação de nutrientes no metabolismo pelas leveduras. A ausência de fermentação implica que os açúcares quando assimilados estão sendo utilizados principalmente na produção de massa celular, ocorrendo baixa produção de etanol.

Tabela 13. Resultados apresentados pelas cepas quando inoculadas nos meios basais de fermentação

Estirpe	Fontes de carbono				
	Glicose	Frutose	Arabinose	Xilose	Lactato
M01	+W	+W	-	-	-
M02	+W	+W	-	-	-
M03	+W	+W	-	-	-
M04	+W	+W	-	-	-
M05	+W	+W	-	-	-
M06	+W	+W	-	-	-
Fermentação fraca (+W); negativa (-)					

CONCLUSÕES

As silagens de capim-Marandu que não receberam polpa cítrica tiveram sua instabilidade caracterizada pela presença de bactérias, altos teores de nitrogênio amoniacal e elevação dos valores de pH após a exposição aeróbia.

A presença do aditivo nas silagens resultou em crescimento de fungos, principalmente de leveduras e promoveu menor estabilidade aeróbia pelo aumento da temperatura no alimento.

Apesar de não haver amplo desenvolvimento de leveduras, a caracterização das cepas revela que as silagens são propensas a rápida deterioração pela assimilação de lactato.

A exposição das silagens ao ar foi acompanhada por deterioração aeróbia, reduzindo os valores de DIVMS em 5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R. N. S., CRESTANA, R. F., NUSSIO, L. G. et al. Efeito do tamanho de partícula na composição da fração nitrogenada de silagem de capim-Tanzânia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:SBZ, 2001. CD ROM.

ANDRIOLI, I., CENTURION, J. F. Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27, 1999, Brasília. **Anais...** Brasília:SBCS, 1999. CD ROM.

ASHBELL, G., LISKER, N. Aerobic deterioration in maize silage stored in a bunker silo under farm conditions in a subtropical climate. **Journal Science Food Agriculture**, v. 45, p. 307-315, 1988.

ASHBELL, G., WEINBERG, Z. G., HEN, Y. et al. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 28, p. 261-263, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analyses of the Association of Official analytical chemists. 11 ed. Washington. 1970. 1015p.

BALSALOBRE, M. A. A., NUSSIO, L. G., MARTHA Jr., G. B. Controle de perdas na produção de silagens de gramíneas tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:SBZ, 2001, p. 890-911.

BEN-GHEDALIA, D., MIRON, J., YOSEF, E. Fermentation of alfalfa silages with ozonated cotton stalks added. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 39, p. 2002-2005, 1991.

BLANCO, P., SIEIRO, C., VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, v. 175, p. 1-9, 1999.

CASTILHO, L. R., MEDRONHO, R. A., ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CHAMBERLAIN, D. G. The silage fermentation in relation to the utilization of nutrients in the rumen. **Process Biochemistry**, v. 1, p. 60-63, 1987.

CHARMLEY, E. Towards improved silage quality – A review. **Canadian Journal Animal Science**, v. 81, p. 157-168, 2001.

CORLETT Jr., D. A., BROWN, M. H. pH and acidity. In: **Microbial ecology of foods**. New York:Academic Press, 1980, p. 92-111.

DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: **FOOD MICROBIOLOGY: Fundamentals and frontiers**. Washington:ASM Press, 1997, p. 520-556.

DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, W. H., VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculant with *Lactobacillus buchneri*, with or without mofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v. 56, p. 330-343, 2001.

GANCEDO, C., SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. In: **THE YEASTS: Metabolism and Physiology of yeasts**. 2 ed. London:Academic Press, 1989, 635p.

GRANUM, P. E. Foodborne pathogenic bacteria: *Bacillus cereus*. In: **FOOD MICROBIOLOGY: Fundamentals and frontiers**. Washington:ASM Press, 1997, p. 327-336.

GUIM, A. Estabilidade aeróbia de silagens de capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) emurchecido e tratado com inoculante microbiano. Tese de Doutorado - UNESP/Jaboticabal, 1997, 86p.

HENDERSON, A. R., EWART, J. M., ROBERTSON, G. M. Studies on aerobic stability of commercial silages. **Journal Science Food Agriculture**, v. 30, p. 223-228, 1979.

HIGGINBOTHAM, G. E., MUELLER, S. C., BOLSEN, K. K., et al. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 2185-2192, 1998.

IGARASI, M. S. Controle de perdas na ensilagem de capim-Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. Cv. Tanzânia) sob os efeitos do teor de matéria seca, do tamanho de partícula, da estação do ano e da presença do inoculante bacteriano. Dissertação de Mestrado -ESALQ/USP, 2002, 132p.

JOBIM, C. C. Avaliação das características microbiológicas, químicas e digestibilidade das silagens de grãos úmidos e de espigas de milho. Tese de Doutorado - UNESP/Jaboticabal, 1996, 98p.

JONSSON, A. Growth of clostridium tyrobutiricum during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. **Journal Science Food Agriculture**, v. 54, p. 557-568, 1991.

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

KUNG Jr., L, RANJIT, N. K. The effect of Lactobacillus buchneri and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. 1149-1155, 1998.

KURTMAN, C. P., FELL, J. W. **The Yeast: A Taxonomic study**. Amsterdam:Elsevier, 1998. 1055p.

LIDGREN, S. PETTERSSON, K., KASPERSON, A., et al. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. **Journal Science Food Agriculture**, v. 36, p. 765-774, 1985.

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

MONTVILLE, T. J. Principles which influence microbial growth, survival and death in foods. In: **FOOD MICROBIOLOGY: Fundamentals and frontiers**. Washington:ASM Press, 1997, p. 13-29.

MUCK, R. E., PITT, R. E., LEIBENSPERGER, R. Y. A model of aerobic fungal growth in silage. 1. Microbial characteristics. **Grass and Forage Science**, v. 46, p. 283-296, 1991.

NUSSIO, L. G., PAZIANI, S. F., NUSSIO, C. M. B. Ensilagem de capins tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39. 2002. Recife. **Anais...** Recife:SBZ, 2002, p. 60-99.

O'LEARY, W. M. **Pratical handbook of microbiology**. 2 ed. New York:CRC Press. 1989, 681p.

OSTLING, C., LINDGREN, S. Influences of enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silages. **Grass and Forage Science**, v. 50, p. 41-47, 1995.

PHUNTSOK, T., ZHENG, M. A., FROETSCHER, Y. W. et al. Silage polyamines: quantitation and relationship to fermentation of forage amino acids. <http://www.ads.uga.edu/anrpt>, 02/02/1998.

PITT, R. E., MUCK, R. E., PICKERING, N. B. A model of aerobic fungal growth in silage. 2. Aerobic stability. **Grass and Forage Science**, v. 46, p. 301-312, 1991.

PRIOR, B. A., KOTTER, P. Pentose utilization by yeasts. In: YEAST SUGAR METABOLISM: Biochemistry, genetics, biotechnology and applications. Lancaster:Technomic Publishing, 1997, p. 435-457.

REIS, R. A., JOBIM, C. C. Perfil da fração de carboidratos da planta e adequação de aditivos no processo de ensilagem. In: Workshop sobre milho para silagem, 2. Piracicaba, 2001. **Anais...** Piracicaba:FEALQ, 2001, p.27-52.

RUSSELL, J. B., RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, p. 1119-1122, 2001.

ROBERTSON, J. B., VAN SOEST, P. J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: THE ANALYSIS OF DIETARY FIBER IN FOOD. New York, 1981, p. 123-158.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2 ed. Viçosa:UFV, 1998, 166p.

SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, 1976, 701p.

TILLEY, J. M. A., TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal British Grassland**, v. 18, p. 104-111, 1963.

VAN DER WALT, R. P., YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. In: **The yeast: a taxonomic study**. Amsterdam:Elsevier Science Pub., 1984, p. 45-62.

VAN SOEST, P. **Nutritional ecology of the ruminant**. New York, 1994. 476p.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. London:Wiley Editorial Offices, 1998, 350p.

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

WOOLFORD, M. K., WHITE, J., BOLSEN, K., LIN, C. J. Benzoic, sorbic acids improve silage stability. **Feedstuffs**. April, p. 11-13, 2001.

APÊNDICE

Apêndice 1. Resumo das análises de variância para os teores de matéria seca (MS), carboidrato solúveis (CHO), pH e nitrogênio amoniacal (N-NH₃)

Causas de variação	G. L.	Quadrado médio			
		MS	CHO	pH	N-NH ₃
Tempo (A)	6	1.4766 ^{**}	0.2376 ^{**}	1.1062 ^{**}	10.5273 ^{**}
Tratamento (B)	2	65.2217 ^{**}	0.563 ^{**}	0.950 ^{**}	18.2581 ^{**}
A x B	12	1.7726 ^{**}	0.0045 ^{**}	0.274 ^{**}	0.5160 ^{**}
CV	-	2.98%	2.75%	1.41%	6.29%

Apêndice 2. Resumo das análises de variância para os teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM), celulose (CEL) e lignina (LIG)

Causas de variação	G. L.	Quadrado médio				
		FDN	FDA	HEM	CEL	LIG
Tempo (A)	6	25.7345 ^{**}	3.0288 ^{NS}	37.9388 ^{**}	2.359 ^{NS}	0.1611 ^{NS}
Tratamento (B)	2	1935.9305 ^{**}	480.2084 ^{**}	521.9461 ^{**}	365.083 ^{**}	10.7051 ^{**}
A x B	12	1.1077 ^{NS}	1.1267 ^{NS}	2.8655 ^{NS}	1.8012 ^{NS}	0.2410 ^{NS}
CV	-	2.74%	4.24%	11.27%	6.29%	6.29%

Apêndice 3. Resumo das análises de variância para os teores de proteína bruta (PB), nitrogênio ligado a fibra em detergente neutro (N-FDN), nitrogênio ligado a fibra em detergente ácido (N-FDA), fração nitrogenada B3 e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

Causas de variação	G. L.	Quadrado médio				
		PB	N-FDN	N-FDA	B3	DIVMS
Tempo (A)	6	0.1271 ^{NS}	363.0715 ^{**}	7.9695 ^{**}	284.5577 ^{**}	8.7474 ^{NS}
Tratamento (B)	2	0.4171 ^{**}	150.1555 ^{**}	1.0519 ^{NS}	131.1672 ^{**}	1898.8866 ^{**}
A x B	12	0.459 ^{NS}	2.2381 ^{NS}	3.3030 ^{**}	6.5697 ^{**}	2.1782 ^{NS}
CV	-	2.52%	5.66%	2.86%	27.67%	6.29%