

JOÃO PAULO SAMPAIO RIGUEIRA

**COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA, PERFIL FERMENTATIVO E
POPULAÇÕES MICROBIANAS EM SILAGENS DE GRAMÍNEAS TROPICAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

JOÃO PAULO SAMPAIO RIGUEIRA

**COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA, PERFIL FERMENTATIVO E
POPULAÇÕES MICROBIANAS EM SILAGENS DE GRAMÍNEAS TROPICAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 1º de Agosto de 2011.

Prof. Sebastião de Campos Valadares Filho
(Coorientador)

Prof^a. Karina Guimarães Ribeiro
(Coorientadora)

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani

Prof. Marcos Inácio Marcondes

Prof. Odilon Gomes Pereira
(Orientador)

Dedico, primeiramente, a Deus.

Aos meus pais, Paulo César Rigueira e Ana Maria Sampaio Rigueira, pelo amor, carinho, apoio incondicional em todos os momentos de minha vida. Eles são os responsáveis por todas as minhas conquistas, pois sem eles nada disso seria possível.

Aos meus irmãos Cláudio, Ana Paula e Juliana, pela torcida para meu sucesso.

Aos meus sobrinhos Lucas e Larissa pela alegria e amor.

À Leila, minha namorada, pessoa indispensável na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo no Brasil e no exterior.

Ao CNPq e à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo financiamento desta pesquisa.

Ao Prof. Odilon Gomes Pereira, em especial pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, pelas sugestões e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Sebastião de Campos Valadares Filho, pelos ensinamentos, pelas sugestões e principalmente pela disposição em ajudar.

Ao Prof. Rasmão Garcia pela orientação na iniciação científica, pelas sugestões apresentadas no sentido de aprimorar o presente trabalho e principalmente pela amizade.

À Professora Karina Guimarães Ribeiro pelas sugestões, amizade e pela disponibilidade para participar da banca.

Ao Prof. Hilário Cuqueto pelas valiosas sugestões e pela disponibilidade para participação da banca.

Ao Prof. Marcos Marcondes pela disponibilidade para participação na banca e pela amizade desde a graduação.

Aos demais professores pelo empenho e excelência no ensino que tanto contribuiu para minha formação.

Aos meus amigos Wender, Héliida, Andréia, Igor, Frederico, Henrique, Leonardo, Rafael Bastos e Rafael Tonucci por fazerem de Viçosa um lugar melhor durante esses anos que vivemos juntos.

Aos amigos de Delaware Mateus (Biriba), Sandra, Marcelo, Tcho, Jonathan, Michelle, Sthefane e Dalton pela convivência e ajuda no inglês.

Ao Dr. Kung pela oportunidade de trabalhar e acompanhar as pesquisas realizadas no seu laboratório.

À professora Célia Lúcia e suas orientadas Karina, Luciana e Carol pela colaboração nas realizações das análises microbiológicas e pelos ensinamentos.

À Leila por sempre estar ao meu lado e ser um ponto de apoio. Não tenho outra palavra a dizer que não seja MUITO OBRIGADO.

Aos companheiros da forragem Celly, Francisco, Hellen, Aline, Lílían e Lady pelos bons momentos no laboratório.

Aos funcionários do Laboratório de Forragicultura e Nutrição Animal do DZO/UFV pelo auxílio e agradável convívio.

À Sara, Lucas e Mariele pela convivência e pela ajuda durante os experimentos e análises laboratoriais.

A todos os colegas da Unimontes, com destaque para Eleuza, Fábio Faria, Felipe, Auri, José Eduardo, Rodinei, Sidnei e Héliida.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado por mais essa conquista.

BIOGRAFIA

JOÃO PAULO SAMPAIO RIGUEIRA, filho de Paulo César Rigueira e Ana Maria Sampaio Rigueira, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 16 de setembro de 1981.

Em julho de 2005, graduou-se em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Em agosto de 2005, iniciou o curso de mestrado em zootecnia pela UFV defendendo sua dissertação em agosto de 2007.

Em outubro de 2007, começou o curso de doutorado em zootecnia pela UFV. Pelo programa PDEE do CNPq, ficou um ano na *University of Delaware, Newark, USA*. Defendeu tese em agosto de 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiv
ARTIGO 1 - COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA, POPULAÇÕES MICROBIANAS E PERFIL FERMENTATIVO DE SILAGENS DE GRAMÍNEAS TROPICAIS CULTIVADAS SOB DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO	1
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
2. Material e Métodos	6
2.1. Considerações gerais	6
2.2. Análise química do solo, colheita e ensilagem da forrageira	6
2.3. Delineamento experimental	7
2.4. Análises laboratoriais	7
2.5. Isolamento de <i>Lactobacillus</i>	8
2.5.1. Isolamento das estirpes de <i>Lactobacillus</i> predominantes nos capins	8
2.5.2. Seleção das colônias	8
2.5.3. Identificação das estirpes selecionadas	9
2.5.4. Caracterização das estirpes selecionadas	10
2.6. Quantificação das populações microbianas	11
2.7. Cálculos das perdas de matéria seca nas silagens	11
2.8. Análise estatística	12
3. Resultados e Discussão	13
3.1. Composição bromatológica das plantas antes da ensilagem	13
3.2. Composição bromatológica das silagens de capim-mombaça e capim-braquiária	15
3.3. pH, N-NH ₃ , perdas por efluente e por gases nas silagens	18
3.4. Isolamento e Caracterização de <i>Lactobacillus spp.</i>	22
3.5. Quantificação das populações microbianas	27
4. Conclusões	30
Referências Bibliográficas	31
ARTIGO 2 - COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA, POPULAÇÕES MICROBIANAS, PERFIL FERMENTATIVO E RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA SECA EM SILAGENS DE CAPIM-MARANDU COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ESTILOSANTES CV. CAMPO GRANDE TRATADAS COM INOCULANTE MICROBIANO	40
Resumo	40
Abstract	41
1. Introdução	42
2. Material e Métodos	44
2.1. Local e condições climáticas	44
2.2. Manejo do capim-marandu	44
2.3. Manejo do estilosantes cv. Campo Grande	44

2.4. Ensilagem.....	44
2.5. Delineamento experimental	45
2.6. Avaliação das perdas e amostragem das silagens	46
2.7. Análises de pH e N-NH ₃	47
2.8. Análises laboratoriais	47
2.9. Análise estatística.....	47
3. Resultados e Discussão	48
3.1. Composição bromatológica das plantas antes da ensilagem.....	48
3.2. Composição bromatológica das silagens	49
3.3. Populações microbianas e perfil fermentativo das silagens.....	52
3.4. Perdas e recuperação de matéria seca das silagens	55
4. Conclusão.....	59
Referências Bibliográficas	60
ARTIGO 3 - POPULAÇÕES MICROBIANAS, PERFIL FERMENTATIVO E COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DE SILAGENS DE CAPIM-MARANDU TRATADAS COM INOCULANTES MICROBIANOS COMERCIAL E ISOLADO DE GRAMÍNEAS TROPICAIS	64
Resumo.....	64
Abstract	65
1. Introdução	66
2. Material e Métodos	68
2.1. Local e condições climáticas.....	68
2.2. Delineamento experimental	68
2.3. Manejo e ensilagem do Capim-marandu.....	68
2.5. Aplicação de inoculantes.....	70
2.6. Análises laboratoriais	70
2.6.1. Análises de pH e N-NH ₃	71
2.6.2. Quantificação das populações microbianas	71
2.7. Análise estatística.....	71
3. Resultados e Discussão	72
3.1. Composição bromatológica das plantas antes da ensilagem.....	72
4. Conclusão.....	79
Referências Bibliográficas	80

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1	Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e carboidratos solúveis (CHO) de plantas de capim-mombaça e capim-braquiária adubados com diferentes doses de nitrogênio	13
Tabela 2	Composição bromatológica das silagens de capim-mombaça e capim-braquiária	16
Tabela 3	Valores médios de pH, amônia, das perda por efluente e perda por gases das silagens	20
Tabela 4	Morfologia e características bioquímicas das estirpes isoladas do capim-mombaça (M) e capim-braquiária (B) colhidos aos 70 dias de rebrotação	24
Tabela 5	Perfil de fermentação de carboidratos dos isolados de plantas de capim-Mombaça	25
Tabela 6	Perfil de fermentação de carboidratos dos isolados de plantas de capim-braquiária	26
Tabela 7	Espécies identificadas pelo teste API 50 CH com as respectivas porcentagens de identificação	27
Tabela 8	Quantificação de bactérias do ácido láctico (BAL), enterobactérias, fungos e leveduras do capim-mombaça e capim-braquiária <i>innatura</i> e das respectivas silagens	29

Artigo 2

Tabela 1	Teores de matéria seca (MS), cinzas, proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido nas diferentes proporções de estilosantes com capim-marandu	48
Tabela 2	Teores de matéria seca (MS), cinzas, proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) das silagens de capim-marandu com diferentes proporções de <i>Stylosanthes</i>	51

Tabela 3	Valores médios de pH, nitrogênio amoniacal, população microbiana de bactérias do ácido láctico (BAL), fungos e leveduras (F/L) e enterobactérias (ENT) em silagens de capim-marandu com diferentes proporções de estilosantes	54
Tabela 4	Valores médios da recuperação de matéria seca (RMS), perdas por efluente (PE) e perdas por gases (PG) das silagens de capim-marandu com diferentes níveis de estilosantes	57
Artigo 3		
Tabela 1	Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) de plantas de capim-marandu antes da ensilagem	72
Tabela 2	Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) das silagens de capim-marandu após 56 dias de fermentação	73
Tabela 3	Perfil fermentativo de silagens de capim-marandu tratadas com inoculante microbiano nos diferentes períodos de fermentação e suas respectivas equações de regressão	75
Tabela 4	População de bactérias do ácido láctico (BAL), enterobactérias (ENT), fungos e levedura em silagem de capim-marandu tratadas com inoculante microbiano nos diferentes períodos de fermentação e suas respectivas equações de regressão	76

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

- Figura 1** Foto do padrão fermentativo de 49 carboidratos para uma das 10
estirpes isoladas, usando o API 50 CH (BioMeurix – França).

Artigo 3

- Figura 1** Detalhe do silo experimental com o material ensilado. 69

RESUMO

RIGUEIRA, João Paulo Sampaio, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2011. **Composição bromatológica, perfil fermentativo e populações microbianas em silagens de gramíneas tropicais.** Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientadores: Karina Guimarães Ribeiro e Sebastião de Campos Valadares Filho.

Este estudo envolveu três experimentos. No primeiro, avaliaram-se as populações microbianas, o perfil fermentativo e a composição bromatológica de silagens de capim-braquiária cv. Basilisk e capim-mombaça sob diferentes doses de nitrogênio (N). As doses de N utilizadas foram 0, 30, 60 e 90 kg ha⁻¹. A espécie de bactéria do ácido láctico predominante nos capins foi o *Lactobacillus fermentum*. Observou-se efeito de interação dose de N x espécie forrageira (P<0,05) sobre os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e carboidratos solúveis (CHO) das silagens. Os valores de pH e as perdas por gases foram influenciados (P<0,05) apenas pela espécie forrageira, apresentando valores superiores para o capim-mombaça. Para os teores de amônia (N-NH₃) e perdas por efluente observou-se o efeito (P<0,05) da interação entre espécies forrageiras e doses de N, registrando-se maior valor de N-amoniaco e de perdas por efluente na silagem de capim-mombaça adubado com 60 kg N ha⁻¹. Verificou-se que a fertilização com N diminuiu os teores de MS nas forragens, além de aumentar os teores de PB, N-NH₃ e perdas por efluente nas silagens. Conclui-se, que adubação nitrogenada não favorece o perfil fermentativo e aumenta as perdas de MS em silagem de gramíneas. No segundo experimento, avaliaram-se o perfil fermentativo, a composição bromatológica, a população microbiana e a recuperação de matéria seca das silagens de capim-marandu consorciadas com diferentes níveis de estilosantes cv. Campo Grande tratadas ou não com inoculante microbiano. Utilizou-se um esquema fatorial 4 x 2 (4 níveis de estilosantes x com e sem inoculante), em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os níveis de estilosantes na massa ensilada foram 0, 10, 20 e 30% do peso total na matéria natural. Objetivou-se com esses níveis simular um pasto consorciado de gramínea e leguminosa em diferentes proporções de estilosantes.

Observou-se o efeito de interação ($P<0,05$) entre os níveis de estilosantes e inoculante microbiano para os teores de MS, perdas por efluente, recuperação de matéria seca e população de fungos e leveduras. O efeito de inoculante ($P<0,05$) foi observado apenas para a população de bactérias do ácido láctico (BAL) nas silagens. Para as perdas de gases, não foram observadas diferenças ($P>0,05$). Verificou-se aumento ($P<0,05$) nos teores de MS, cinzas e PB com aumento dos níveis de estilosantes. Em relação aos teores de fibras, foi possível observar a diminuição ($P<0,05$) de FDN e FDA com aumento dos níveis de estilosantes nas silagens. A adição crescente de estilosantes melhorou o perfil fermentativo das silagens por meio da diminuição ($P<0,05$) dos valores de pH e nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$). Observou-se maior ($P<0,05$) população de BAL nas silagens inoculadas e com maior nível de estilosantes. Para as perdas por efluente, verificou-se diminuição linear com o aumento nos níveis de estilosantes nas silagens. Foi observada uma maior ($P<0,05$) recuperação de matéria seca para os tratamentos com 10 e 20% de estilosantes, independentemente do uso de inoculante microbiano. Conclui-se que a mistura de capim-marandu com estilosantes melhora a composição bromatológica e o perfil fermentativo, além de diminuir as perdas de matéria seca das silagens, independente do uso de inoculante microbiano. No terceiro experimento, avaliaram-se a população microbiana, o perfil fermentativo e a composição bromatológica de silagens de capim-marandu tratadas com inoculantes microbianos comerciais e BAL isoladas de gramínea tropical. Utilizou-se um esquema fatorial 3 x 6 (três inoculantes x seis períodos de fermentação), em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os períodos de fermentação foram 1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias após o fechamento dos silos. Observou-se menor ($P<0,05$) teor de fibra em detergente neutro para o tratamento com inoculante M17. Não houve efeito de inoculante ($P>0,05$) nos teores de PB e FDA. Para o teor de MS, foi observado um aumento ($P<0,05$) nas silagens inoculadas com Sil All C4. Verificou-se o efeito de interação entre inoculante e períodos de fermentação para a população de BAL e pH. As silagens inoculadas com Sil All C4 apresentaram menor ($P<0,05$) pH no primeiro dia, porém, aos 56 dias o valor observado foi superior ($P<0,05$) ao dos demais tratamentos. O teor de nitrogênio amoniacal foi superior ($P<0,05$) nas silagens inoculadas com M17 em

relação ao controle, observando-se aumento linear com o avanço do período de fermentação para todos os tratamentos. Em relação à população microbiana, identificou-se uma maior ($P<0,05$) população de fungos e leveduras na silagem controle e menor população ($P<0,05$) BAL nas silagens inoculadas com M17 nos três dias de fermentação. Conclui-se que o uso de aditivos microbianos em silagem de capim-marandu não apresenta benefícios no processo fermentativo e na composição bromatológica.

ABSTRACT

RIGUEIRA, João Paulo Sampaio, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2011. **Chemical composition, fermentation profile and microbial populations in tropical grass silages.** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-Advisers: Karina Guimarães Ribeiro and Sebastião de Campos Valadares Filho.

This study consisted of three experiments. At first evaluated the microbial populations, fermentation profile and the chemical composition of *Brachiaria brizantha* cv. Basilisk and mombaça grass silage under different levels of nitrogen (N). The N rates used were 0, 30, 60 and 90 kg ha⁻¹. *Lactobacillus fermentum* was the predominant lactic acid bacteria species in tropical grass. Interaction effect of N rate x grass species (P<0.05) was observed on dry matter (DM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and soluble carbohydrates (CHO) of silages. The values of pH and gas losses were influenced (P<0.05) only by forage species, with higher values for mombaça grass. For contents of ammonia (NH₃-N) and effluent losses observed interaction effect (P<0.05) between forage species x N rates, registering the highest NH₃-N and effluente losses in mombaça grass silage fertilized with 60 kg N ha⁻¹. There was also that N fertilization decreased DM in forages and increases the CP, NH₃-N and effluent losses in silage. It is concluded that nitrogen does not favor the fermentation profile and increases the DM losses in grass silage. In the second experiment, evaluated the fermentation profile, chemical composition, the microbial population and the recorvery of dry matter in marandu grass silages consortium with different levels of estilosantes cv. Campo Grande treated or not with inoculant. It was used a factorial 4 x 2 (four level of estilosantes x with and without inoculants) in a completely randomized design with four replications. The levels of estilosantes in ensiled mass were 0, 10, 20 and 30% of the total weight in natural matter. The purpose of using these levels was to simutate a pasture grass and legume intercropping in different proportions of estilosantes. There was interaction effect (P<0.05) between the

levels of estilosantes and inoculants for DM, effluente losses, dry matter recorvery and population of fungi and yeasts. The effect of inoculants ($P<0.05$) was observed only for the population of lactic acid bacteria (LAB) on silage. For the loss of gas, there was no significant differences ($P<0.05$) in any of the treatments. There was an increase ($P<0.05$) in DM, ash, and CP with increased levels of estilosantes. With respect to fiber content, it was lower ($P<0.05$) NDF and ADF concentrations with increased levels of estilosantes in silage. The addition growing of estilosantes improved silage fermentation by decreasing ($P<0.05$) pH values and ammonia nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$). Was observed higher ($P<0.05$) population of LAB inoculated silages and with higher estilosantes level. Was observed higher ($P<0.05$) dry matter recorvery for treatments with 10 and 20% of estilosantes, irrespective of the use of microbial inoculants. Conclude that the mixture of marandu grass with estilosantes improves the chemical composition and fermentation profile, in addition reducing the losses of dry matter silages regardless of the use of microbial inoculants. In the third experiment, evaluated the microbial population, the fermentation profile and chemical composition of marandu grass silage treated with commercial microbial inoculants or inoculants isolated from tropical grasses. Was used factorial 3×6 (three inoculants $\times$ six fermentation periods) in a completely randomized design with three replications. The fermentation periods were 1, 3, 7, 14, 28 and 56 days after the close of the silos. There was less ($P<0.05$) content of neutral detergent fiber for the treatment with inoculant M17. There was no effect of inoculant ($P>0.05$) in CP and ADF concentration. For the DM content, there was an increase ($P<0.05$) in silages inoculated with Sil All C4. There was interaction effect between inoculants and fermentation periods for the LAB population and pH. The silages inoculated with Sil All C4 had lower ($P<0.05$) pH on the first day, but at 56 days the observed value was higher ($P<0.05$) to the other treatments. The concentration of ammonia nitrogen was higher ($P<0.05$) in silagens inoculated with M17 as compared to control. Linear increase was observed with the progress of the fermentation period for all treatments. Regarding the microbial population, there was greater ($P<0.05$) population of fungi and yeasts in silage and lower control population ($P<0.05$) in LAB silages inoculated with M17 to three days

of fermentation. Conclude that the use of microbial silage additives in marandu grass silage not show of benefit for the fermentation profile and chemical composition.

ARTIGO 1 - COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA, POPULAÇÕES MICROBIANAS E PERFIL FERMENTATIVO DE SILAGENS DE GRAMÍNEAS TROPICAIS CULTIVADAS SOB DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO

Resumo – Avaliou-se o perfil fermentativo, a composição química, a população microbiana e as perdas por gases e efluente de silagens dos capins braquiária e mombaça adubados com diferentes doses de nitrogênio (N): 0, 30, 60 e 90 kg ha⁻¹, utilizando como fonte de N o sulfato de amônio. Os capins foram colhidos aos 70 dias de rebrotação, picados e ensilados em silos laboratoriais de 20 kg de capacidade, com tampa de encaixe próprio, providos com válvula de Bunsen. Amostras das plantas antes da ensilagem foram utilizadas para os isolamentos e a identificação das bactérias do ácido láctico (BAL) na microbiota epifítica. A identificação dos isolados foi realizada por meio da fermentação de carboidratos em kit API CH 50 (BioMeurix – França), utilizando-se o software API (BioMeurix – França). Utilizou-se um esquema fatorial 4 x 2, sendo quatro doses de N e duas espécies forrageiras, em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. A espécie de BAL predominante em ambos os capins foi a *Lactobacillus fermentum*. Observou-se o efeito de interação entre a dose de N e a espécie forrageira (P<0,05) sobre os teores de MS, PB, FDN, FDA e CHO das silagens. Os valores de pH e as perdas por gases foram influenciados (P<0,05) apenas pela espécie forrageira, apresentando valores superiores para o capim-mombaça. Para os teores de amônia (N-NH₃) e perdas por efluente houve efeito (P<0,05) da interação entre espécies forrageiras e doses de N, registrando-se maior valor de N-amoniacal e de perdas por efluente na silagem de capim-mombaça adubado com 60 kg N ha⁻¹. A adubação nitrogenada reduziu o teor de matéria seca nas silagens de ambas as forrageiras. Observou-se que a fertilização com N diminui os teores de MS e CHO das silagens, além de aumentar os teores de PB, N-NH₃ e perdas por efluente. Conclui-se, portanto, que a adubação nitrogenada não favorece o perfil fermentativo e aumenta as perdas de MS em silagens de gramíneas.

Palavras-chaves: Amônia, bactérias do ácido láctico, efluente, pH

Abstract - This study evaluated the fermentation profile, chemical composition, the microbial population and the loss of gases and effluent from mombaça and braquiária grass silage fertilized with different doses of nitrogen (N): 0, 30, 60 and 90 kg ha⁻¹, using as a source of N the ammonium sulphate. The grasses were harvested at 70 days of regrowth, chopped and ensiled in laboratory silos of 20 kg capacity, with proper-fitting lid, fitted with Bubsen valve. Samples of the plants before ensiling were used for the isolation and indentification of lactic acid bacteria (LAB) on the epiphytic microflora. The identification of isolates was carried out by the fermentation of carbohydrates in API CH 50 kit (BioMeuriz – France), using the software API (BioMeurix- France). Was used a 4 x 2 factorial design, four doses of N and two forage species in a completely randomized design with four replications. *Lactobacillus fermentum* was the predominant specie isolated by tropical grasses. Was observed interaction effect of N rate x grass species (P<0.05) on dry matter (DM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and soluble carbohydrate (CHO) content in silage. The levels of pH and gas losses were influenced (P<0.05) only by forage species, with higher values for mombaça grass. For contents of ammonia (NH₃-N) and effluent losses was no effect (P<0.05) interaction between forage species and N levels, registering the highest ammonia and effluent losses in mombaça grass silage fertilized with 60 kg N ha⁻¹. Nitrogen fertilization reduced dry matter content of silages of both forages. Was observed that N fertilization decreased the levels of DM and CHO silage, in addition to increasing concentrations of CP, NH₃-N and effluent losses. Conclude, therefore, that the nitrogen does not favor the fermentation and increases the DM losses in grass silage.

Keywords: Ammonia, lactic acid bacteria, effluent, pH

1. Introdução

A pecuária brasileira fundamenta-se na utilização das pastagens, as quais representam a forma mais prática e econômica de alimentação de ruminantes. Entretanto, os índices zootécnicos vigentes ainda estão distantes daqueles que poderiam ser considerados ideais. A taxa de desfrute, índice que se destina a medir a eficiência produtiva, é um forte indicativo de que a pecuária nacional carece de maior eficiência. A baixa taxa de natalidade e a elevada idade de abate dos animais são os dois principais motivos que resultam na taxa de desfrute ao redor de 20%. Essa baixa produtividade é atribuída à estacionalidade na oferta de alimento proveniente de pastagens, alternando-se períodos em que a disponibilidade e a qualidade da forragem são elevadas, com períodos em que há comprometimento no crescimento das plantas, devido a variações nos elementos do clima. Isso reflete no desempenho produtivo dos animais mantidos em pasto, resultando em períodos de safra e entressafra de produtos.

Em face disso, tem que se proceder o ajuste entre demanda e suprimento de forragem, por meio de adequado planejamento alimentar, objetivando atenuar a escassez de forragem no período seco possibilitando, assim, a uniformidade da produção animal ao longo do ano. A conservação do excedente de forragem, produzida na época das águas pelas espécies perenes, deve ser considerada como recurso forrageiro potencial para alimentação dos animais no período seco do ano. Esta estratégia facilita o manejo do pasto, além de prover os animais de alimento com alto valor nutritivo permitindo, assim, a elevada produtividade das forrageiras em condições tropicais.

Considerando que as pastagens de gramíneas do gênero *Brachiaria* ocupam aproximadamente de 80 a 90% das áreas de pastagens no Brasil (Boddey et al., 2004) e que a espécie *Panicum maximum* apresenta alto potencial de produção de massa seca em ambientes tropicais, justifica-se o interesse na produção de silagens com essas gramíneas.

Silagens de gramíneas dos gêneros *Panicum* e *Brachiaria* têm se constituído

em um dos volumosos mais utilizados nos confinamentos no Brasil. Dados indicam que silagens de capim foram usadas por 18% dos 50 maiores confinamentos de gado de corte do Brasil, no ano de 2006, se constituindo no quinto alimento volumoso mais utilizado (Agripoint, 2007).

As silagens de capim possuem algumas vantagens interessantes, como elevada produção anual por área, perenidade, baixo risco de perda e maior flexibilidade de colheita (Corrêa et al., 2001). Em contrapartida, possuem, também, aspectos desfavoráveis como baixo teor de carboidratos solúveis necessários para uma fermentação adequada, baixo teor de matéria seca no momento do corte, alto poder tampão e menor teor energético, em comparação com o milho ou sorgo aumentando, assim, a necessidade de suplementação concentrada na dieta.

Avaliações criteriosas demonstraram que o quilograma de NDT de uma silagem de capim é mais caro que a da silagem de milho. Desse modo, as gramíneas tropicais só se tornam opção interessante caso venham acompanhadas de alta produtividade. Partindo do princípio de que o potencial de produção de biomassa tem que ser alcançado, o uso de nitrogênio pode ser uma alternativa viável para potencializar a produção de matéria seca.

O nitrogênio é considerado o nutriente que causa maior resposta ao desenvolvimento e produção de plantas forrageiras. O aumento na produção de matéria seca tem relação direta com a melhora nos índices zootécnicos para produção de carne e de leite sendo, portanto, um dos insumos essenciais ao manejo da pastagem em sistemas de produção de bovinos.

De acordo com Colozza (1998), diversos estudos têm demonstrado aumentos significativos na produção de massa seca e no valor nutricional de *Panicum maximum* com o suprimento de nitrogênio e, apesar de na maioria desses estudos terem ocorrido respostas lineares ao nitrogênio, a magnitude dessas respostas têm sido diferente, concluindo-se pela necessidade de se estudar as doses de nitrogênio aplicadas, assim como a frequência do seu suprimento para melhor entender o comportamento produtivo dessas plantas.

Apesar de a literatura apresentar muitas informações sobre os efeitos do nitrogênio na produtividade e no valor nutritivo da forragem produzida, ainda são escassas as informações sobre os efeitos da adubação nitrogenada no perfil fermentativo, na população autóctone de microrganismos e nas perdas durante a fermentação, em espécies forrageiras tropicais. Alguns trabalhos desenvolvidos em condições de clima temperado mostraram que a aplicação de fertilizantes nitrogenados altera a composição bromatológica da forragem colhida pelo aumento na concentração de proteína bruta, pela diminuição no teor de matéria seca, alteração do poder tampão e na concentração de carboidratos solúveis (Keady et al, 1995; Keady e Mayne, 1996; Keady e O'Kiwly, 1996) alterando-se, assim, a qualidade da silagem produzida.

Considerando o exposto acima, objetivou-se com este trabalho avaliar o perfil fermentativo, a composição bromatológica, caracterizar e quantificar a população de bactérias produtoras do ácido láctico em silagens de *Panicum maximum* cv. Mombaça e de *Brachiaria decumbens* cv Basilisk, cultivados sob diferentes doses de nitrogênio.

2. Material e Métodos

2.1. Considerações gerais

O experimento foi conduzido em áreas de pastos distintos formados com *Panicum maximum* cv. Mombaça e de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, no Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa, localizada no município de Viçosa-MG. As análises laboratoriais das forragens e das silagens, assim como o isolamento e identificação das bactérias do ácido láctico foram realizadas no Laboratório de Forragicultura do DZO. A cidade de Viçosa está situada a 20°45' de latitude sul e 42°51' de longitude oeste, a 657 m de altitude, apresentando precipitação média anual de 1341 mm, dos quais cerca de 86% ocorrem nos meses de outubro a março. O solo local é classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo, com textura franco-argilosa.

2.2. Análise química do solo, colheita e ensilagem da forrageira

Antes do início do experimento, foi realizada a amostragem de solo, na camada de 0 a 20 cm de profundidade, em todas as parcelas da área experimental com objetivo de monitorar a fertilidade do solo. Em virtude da análise química das amostras de solo, não houve a necessidade de correção do pH do solo. Com objetivo de uniformizar a altura e o crescimento das forrageiras, foi feito o corte de uniformização do capim em toda a área experimental, em dezembro de 2008. Foram demarcadas oito parcelas de 200 m² cada, sendo quatro para cada espécie forrageira. Em seguida, foram aplicadas as doses de nitrogênio conforme os tratamentos: 0; 30; 60 e 90 kg ha⁻¹, sendo aplicada em cada parcela a dose correspondente a 60 kg ha⁻¹ de K₂O. Foram utilizados o sulfato de amônia e o cloreto de potássio como fontes de nitrogênio e potássio, respectivamente.

As plantas foram colhidas aos 70 dias de rebrotação, com roçadeira costal e picadas em máquina ensiladora estacionária. A forragem foi ensilada em baldes com capacidade de 20 kg, dotados de válvula de Bünsen na tampa, para escape dos gases,

num total de 32, sendo quatro repetições para cada tratamento. No fundo dos baldes, foram colocados 4 kg de areia dentro de sacos de tecido de algodão, para captura do efluente. Os baldes foram pesados após a ensilagem e, no momento da abertura, para a quantificação das perdas de matéria seca e por gases. Os silos experimentais foram mantidos em área coberta, à temperatura ambiente, sendo abertos 90 dias após o fechamento.

2.3. Delineamento experimental

Foi utilizado o esquema fatorial 4 x 2, no delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro doses de nitrogênio (0; 30; 60 e 90 kg ha⁻¹), silagens de duas espécies forrageiras (*P. maximum* cv. Mombaça e *B. decumbens*) e quatro repetições.

2.4. Análises laboratoriais

A pré-secagem do capim *in natura* e de suas respectivas silagens foi realizada em estufa de ventilação forçada a 55° C, por 72 h e, em seguida, moídas em moinho tipo “Willey”, com peneira de 1 mm e armazenadas em potes plásticos de polietileno para posteriores análises laboratoriais. Nas amostras moídas foram efetuadas determinações de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB), segundo técnicas descritas por Silva e Queiróz (2002), fibras em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA), segundo Van Soest e Robertson (1985).

Para determinação do pH, 25 g de amostras de silagem foram homogeneizadas, em 225 mL de solução tampão fosfato (Ringer Solution) – cloreto de sódio (2,25 g L⁻¹), cloreto de potássio (0,105 g L⁻¹), cloreto de cálcio anidro (0,12 g L⁻¹), bicarbonato de sódio (0,05 g L⁻¹) e tiosulfato de sódio (0,25 g L⁻¹); durante 1 minuto, em liquidificador. Em seguida, foi realizada a filtragem dessa mistura em papel de filtro Whatman 54, para obtenção do extrato aquoso, sendo imediatamente realizada a leitura do pH, utilizando-se peagâmetro digital.

Para determinação do nitrogênio amoniacal, 200 mL de solução de H₂SO₄, 2 N, foram adicionados a 25 g de silagem, permanecendo em repouso em geladeira por 48 h. Após filtragem em papel de filtro, a concentração de N-NH₃ foi determinada por titulação em ácido fraco, segundo metodologia descrita por Bolsen et al. (1992).

Os teores de carboidratos solúveis foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Johnson et al. (1996).

2.5. Isolamento de *Lactobacillus*

2.5.1. Isolamento das estirpes de *Lactobacillus* predominantes nos capins

O isolamento dos *Lactobacillus* predominantes nos capins antes da ensilagem foi realizado por meio do cultivo em meio Ágar Rogosa (Difco), a 37°C, por 48 h. Foram coletadas amostras, aleatoriamente, das diferentes espécies de gramíneas e nas diferentes doses de nitrogênio e, em seguida, confeccionou-se uma amostra composta para cada espécie forrageira, que foram imediatamente levadas ao laboratório para análises.

Em um liquidificador industrial, foram misturados, durante 1 minuto, 25 g de forragem e 225 ml de solução tampão fosfato estéril, obtendo-se diluição de 10⁻¹. Diluições decimais foram feitas a partir de 10⁻¹ até a 10⁻⁷, realizando o plaqueamento em duplicata em Placas de Petri estéreis. Das diluições mais elevadas, selecionou-se uma quantidade de colônias equivalente à raiz quadrada do valor total de unidades formadoras de colônias (UFC) observadas nas placas, de modo a selecionar as estirpes predominantes no meio.

2.5.2. Seleção das colônias

As colônias selecionadas nas maiores diluições foram cultivadas em caldo MRS (De Man et al., 1960), a 37°C, por 48 h. Em seguida, realizaram-se dois isolamentos em estrias simples, em meio sólido para separação e purificação das

culturas isoladas. Realizou-se o teste de coloração de Gram e de reação à enzima catalase. As culturas gram-positivas, em forma de bacilos, e catalase negativas foram novamente cultivadas em caldo MRS (De Man et al., 1960), para posterior realização dos testes de identificação.

2.5.3. Identificação das estirpes selecionadas

A identificação dos isolados de BAL nas amostras dos capins foram realizadas pelo perfil fermentativo de 49 carboidratos do kit API CH 50 (BioMeurix - França). Quatro culturas puras provenientes do capim-braquiária e seis culturas do capim-mombaça com morfologias semelhantes, catalase negativas e gram-positivas foram submetidas a três ativações sucessivas. Posteriormente, cada cultura foi centrifugada a 10.000 rpm, por 10 minutos, em tubos de centrífuga de polipropileno, com tampas rosqueáveis e previamente esterilizados. Após o descarte do sobrenadante, os *pellets* dos concentrados celulares foram ressuspensos em 5 mL de tampão fosfato (pH=7,2) estéril, para lavagem das células. Em seguida, nova centrifugação foi efetuada. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 2 mL do tampão fosfato. A padronização do inóculo foi realizada, adicionando-se gotas do inóculo inicial em 5 mL de água destilada, para se obter densidade ótica de $0,70 \pm 0,2$ em espectrofotômetro a 550 nm. O dobro da quantidade de gotas gasta foi adicionado em 10 mL de meio CHL (MRS modificado, sem adição de extrato de carne e glicose, e adicionado de púrpura de bromocresol). A suspensão bacteriana em meio CHL foi distribuída nas cúpulas da bandeja, com posterior cobertura de óleo mineral, para manutenção de anaerobiose e evitar o ressecamento do meio na BOD. As bandejas foram incubadas a 37°C em estufa BOD e nos tempos de 24 e 48 horas procedeu-se à leitura dos testes de fermentação de carboidratos, por meio da mudança de coloração do azul para o amarelo como observado na Figura 1. A identificação foi realizada pelo software API (Bio Meurix - França), que expressa o resultado em percentual de identidade de acordo com o padrão de utilização de açúcares pela bactéria inoculada.



Figura1- Foto do padrão fermentativo de 49 carboidratos para uma das estirpes isoladas, usando o API 50 CH (BioMeurix – França).

2.5.4. Caracterização das estirpes selecionadas

Foram realizados testes de crescimento dos isolados em diferentes valores de pH (9,6 e 7,2) e em temperaturas de 15 e 45°C. Para o teste de crescimento nos diferentes pH foi utilizado caldo MRS acidificado com ácido acético glacial e aferido em peagômetro digital. Os isolados também foram incubados a 15° e a 45°C, em

caldo MRS. Após 24 horas de incubação, observou-se, pela turbidez dos meios, se houve crescimento nessas diferentes condições.

2.6. Quantificação das populações microbianas

As populações microbianas foram quantificadas, utilizando-se meios de culturas seletivos para cada grupo microbiano: Agar Rogosa (Difco), para enumeração das bactérias do ácido láctico; Violet Red Bile (Difco) em sobrecamada, para enumeração de enterobactérias e Batata Dextrose Agar (BDA), para enumeração de fungos e leveduras.

2.7. Cálculos das perdas de matéria seca nas silagens

As perdas de matéria seca nas silagens sob as formas de gases e efluentes foram quantificadas por diferença de peso, segundo Schmidt (2006). Pela equação abaixo, foram obtidas as perdas por efluente:

$$E = (Pab - Pen) / (MVfe) \times 1000, \text{ onde:}$$

E: produção de efluentes (kg/tonelada de massa verde);

Pab: peso do conjunto (balde+tampa+areia úmida+pano) na abertura (kg);

Pen: peso do conjunto (balde+tampa+areia seca+pano) na ensilagem (kg);

MVfe: massa verde de forragem ensilada (kg).

A perda de matéria seca na forma de gases foi calculada pela diferença entre o peso bruto da matéria seca ensilada inicial e final, em relação à quantidade de MS ensilada, descontados o peso do conjunto silo e areia seca, conforme a equação abaixo:

$$G = \frac{[(PCen - Pen) * MSen] - [(PCab - Pen) * MSab]}{[(PCen - Pen) * MSen]} \times 100$$

Em que:

G: perdas por gases (%MS);

PCen: peso do balde cheio na ensilagem (kg);

Pen: peso do conjunto (balde+tampa+areia seca+pano) na ensilagem (kg);

MSen: teor de matéria seca da forragem na ensilagem;

PCab: peso do balde cheio na abertura (kg);

MSab: teor de matéria seca da forragem na abertura.

2.8. Análise estatística

A avaliação dos dados foi realizada por meio de análise de variância, a 5% de significância, utilizando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2000). Para o fator qualitativo (espécie forrageira) utilizou-se o teste “F” e para o fator quantitativo (doses de N) foi realizada análise de regressão. O desdobramento da interação (dose de N x espécie forrageira) foi efetuado quando esta foi significativa a 5% de probabilidade.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição bromatológica das plantas antes da ensilagem

Na Tabela 1, encontra-se a composição bromatológica das plantas antes da ensilagem. Os teores de matéria seca (MS) variaram de 16,1 à 22,6%. O menor teor de MS no capim-mombaça adubado com 60 kg N ha⁻¹ se deve, provavelmente, a erros metodológicos. Além disso, esse material foi o primeiro a ser colhido, permanecendo por menor tempo no campo antes de ser picado e ensilado.

Tabela 1- Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e carboidratos solúveis (CHO) de plantas de capim-mombaça e capim-braquiária adubados com diferentes doses de nitrogênio

Forrageira	Doses de Nitrogênio (kg/ha)			
	0	30	60	90
	Matéria Seca			
Mombaça	19,52	21,12	16,08	22,58
Braquiária	21,36	21,14	20,35	21,60
	Proteína Bruta (% MS)			
Mombaça	5,47	5,32	6,02	6,75
Braquiária	5,55	5,27	5,89	6,02
	Fibra em Detergente Neutro (% MS)			
Mombaça	71,48	68,67	72,76	71,52
Braquiária	70,47	72,83	71,70	73,47
	Fibra em Detergente Ácido (% MS)			
Mombaça	36,98	34,42	40,73	36,58
Braquiária	34,88	37,79	38,00	38,46
	Carboidratos Solúveis (% MS)			
Mombaça	3,86	3,77	2,83	3,14
Braquiária	3,60	4,47	3,11	3,39

O teor de MS é de suma importância para produção de silagens de boa qualidade, porém, têm-se observado grande variação nos valores de gramíneas colhidas em uma mesma idade de rebrotação, em diferentes locais. Isso indica que a idade de rebrotação não é uma característica adequada para se determinar o momento de corte em forrageiras tropicais destinadas a ensilagem, uma vez que outros fatores, como fertilidade do solo, precipitação pluvial e radiação solar exercem grande efeito sobre o teor de MS de plantas forrageiras. Então, a altura da planta poderia ser um fator interessante a ser avaliado juntamente com a idade de rebrota para determinação do momento mais apropriado ao corte e ensilagem.

Houve aumento nos teores de proteína bruta com a elevação das doses de N em ambas forrageiras. Isso se deve à maior disponibilidade de N no solo, favorecendo a absorção e acúmulo de N nos tecidos da planta. Outro possível fator é que o N aplicado tenha favorecido o perfilhamento da planta e, conseqüentemente, aumentado a proporção de folhas. Como os teores de PB das folhas são superiores aos demais tecidos da planta, justifica-se o aumento no teor de PB em maiores doses de N.

Keady et al. (2000) observaram aumento no teor de PB com incremento das doses de 72 para 168 kg N ha⁻¹ em gramíneas. O mesmo efeito foi observado por Wilson (1969); Keady e O'Kiedk, (1996, 1998) e Ribeiro (1995, 2000). Segundo Pedreira et al. (2001), quando o nitrogênio é deficiente, o perfilhamento é inibido e, ao aumentar o suprimento de N, há acréscimo no número de perfilhos por planta.

Não se observaram grandes variações nos teores de fibras com aumento nas doses de nitrogênio, indicados pelas concentrações de FDN e FDA. A ausência de efeito da adubação nitrogenada sobre o teor de FDN também foi observada por Wilman (1975); Wilman et al. (1976) e Gomide e Costa (1984). Os valores próximos desses constituintes nas diferentes doses de N sugerem que o N favoreceu, principalmente, o perfilhamento da planta em relação ao crescimento em altura. Se o aumento da produção de MS tivesse se dado pelo crescimento vertical das plantas, possivelmente estas teriam maior proporção de fibras necessárias a sua sustentação.

Os teores de carboidratos solúveis variaram de 2,83% no capim-mombaça, na dose de 60 kg ha⁻¹, a 4,47% no capim-braquiária, na dose 30 kg ha⁻¹. Keady e

O’Kiely (1996) e Wilson (1969) observaram diminuição nos teores de carboidratos solúveis e maior poder tampão com aumento das doses de N aplicadas em gramíneas. O teor de carboidrato solúvel é de suma importância para produção de silagem de boa qualidade, uma vez que este é a principal fonte de nutrientes para o crescimento dos microrganismos produtores de ácido lático. McDonald et al. (1991) preconizam que o potencial de uma planta para ensilagem é dependente do teor de carboidratos solúveis, sendo desejáveis teores acima de 8% na MS. Porém, é reconhecido que gramíneas tropicais apresentam baixo teor de carboidratos solúveis, conforme verificado por Bergamaschine et al. (2006).

3.2. Composição bromatológica das silagens de capim-mombaça e capim-braquiária

Na Tabela 2, encontram-se os dados da composição bromatológica das silagens dos capins braquiária e mombaça, as equações de regressão e os respectivos coeficientes de variação. Observou-se efeito ($P < 0,05$) da interação dose de N x espécie forrageira sobre os teores de MS, PB, FDN, FDA e CHO das silagens. O menor teor de matéria seca observado na silagem de capim-mombaça adubada com 60 kg ha^{-1} se justifica pelo menor teor de MS da planta no momento da ensilagem em relação às demais. Os teores de MS nas silagens apresentaram valores superiores em relação à matéria seca original das plantas. Isso se deve, possivelmente, à perda de água por lixiviação durante o período de fermentação. Além disso, perdas de nutrientes, devido a fermentações secundárias, também podem contribuir para aumentos nos teores de MS das silagens em relação à forragem original. Comportamento semelhante a esse foi observado em silagens de capim-marandu (Bernardes et al., 2008; Cezário, 2011) e de capim-mombaça (Ávila et al, 2009).

Tabela 2- Composição bromatológica das silagens de capim-mombaça e capim-braquiária

Silagens	Dose de Nitrogênio (kg/ha)				CV (%)	Equações de Regressão	R ²
	0	30	60	90			
	Matéria Seca				2,34		
Mombaça	21,43a	21,77a	18,47b	18,98b		$\hat{Y} = 21,759 - 0,03545X$	0,67
Brachiaria	22,03a	22,05a	20,94a	19,97a		$\hat{Y} = 22,34375 - 0,024333X$	0,89
	Proteína Bruta (%MS)				5,43		
Mombaça	5,17a	5,28a	6,15a	6,05a		$\hat{Y} = 4,94625 + 0,014375X$	0,85
Brachiaria	4,90a	4,78b	4,85b	4,76b			
	FDN (%MS)				1,81		
Mombaça	68,22a	70,09a	72,06a	71,74a		$\hat{Y} = 67,94725 + 0,125117X - 0,000889X^2$	0,89
Brachiaria	69,99a	70,00a	69,34b	69,64b			
	FDA (%MS)				3,02		
Mombaça	37,03a	36,53a	41,99a	40,29a		$\hat{Y} = 36,376625 + 0,080888X - 0,000334X^2$	0,58
Brachiaria	37,23a	37,60a	37,35b	38,01b			
	Carboidrato Solúvel (%MS)				18,24		
Mombaça	1,15b	1,32b	1,85a	1,27b		$\hat{Y} = 1,07375 + 0,02175X - 0,000208X^2$	0,62
Brachiaria	1,69a	1,75a	0,98b	1,69a		$\hat{Y} = 1,805125 - 0,018621X + 0,000178X^2$	0,33

* Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem (P<0,05) pelo teste "F".

Observou-se efeito linear de doses de N sobre os teores de MS das silagens de mombaça e braquiária, estimando-se reduções de 0,0345 e 0,0243 unidades percentuais de MS, por quilo de nitrogênio aplicado, respectivamente. Reduções nos teores de MS em silagens de gramíneas com aumento na dose de N também foram observadas por Wilson (1969); Keady et al. (2000); Keady e O'Kiedk. (1996, 1998). Namihira (2009) avaliou diferentes doses e fontes de N e observou diminuição nos teores de MS com aumento das doses, porém, não foi observado efeito entre as diferentes fontes de N. O nitrogênio aumenta a suculência das plantas, fazendo com que plantas adubadas com N apresentem maior teor de água em relação às não adubadas (De faria, 1971).

Observou-se maior teor de PB na silagem de capim-mombaça em relação à de braquiária em todas as silagens, exceto naquela de plantas não adubadas com nitrogênio. Santos et al. (2007) e Pereira et al. (2006) também verificaram maiores valores de PB no capim-mombaça (5,72%) em relação ao capim-braquiária (3,80%). Observou-se aumento linear do teor de PB na silagem de mombaça com o incremento da dose de N. Isso se deve, provavelmente, ao maior perfilhamento e consequente aumento no número de folhas por perfilhos no capim-mombaça, em relação à braquiária. Wilson (1969) e Keady et al. (2000) também observaram aumento nos teores de PB com aumento das doses de N.

Avaliando-se o efeito de doses de N dentro de silagens, constatou-se maiores valores ($P < 0,05$) de FDN e FDA nas silagens de capim-mombaça de plantas adubadas com 60 e 90 kg N ha⁻¹. Isso se deve, provavelmente, ao porte mais elevado do capim-mombaça em relação à braquiária, necessitando de maior quantidade de fibra para sustentação da planta.

No desdobramento de capim nas diferentes doses de N, observou-se efeito do capim-mombaça para os teores de FDN e FDA, cujos dados ajustaram-se a modelos quadráticos, com valor máximo de FDN de 70,37%, na dose 72,35 kg N e valor mínimo de FDA de 41,17% na dose 39,14 kg N. Os teores de fibra de ambas as silagens são próximos aos encontrados por Santos (2007), que verificou valores de FDN e FDA de 64,0 e 32,4% e 62,2 e 40,7% para as silagens de capim mombaça e

braquiária, respectivamente. No entanto, o efeito da adubação nitrogenada sobre os constituintes fibrosos das plantas não são consistentes (Wilman, 1975; Wilman et al., 1976; Gomide e Costa, 1984).

Observou-se menor teor de CHO's solúveis em água nas silagens de braquiária de plantas adubadas com 60 kg de N, enquanto que nas demais doses foi observado menor teor nas silagens de capim-mombaça. Esse comportamento indica maior consumo desses CHO's nas silagens de mombaça, sugerindo, assim, melhor padrão de fermentação. No entanto, essa hipótese parece não ter sustentação, já que as silagens de capim-mombaça estabilizaram em pH mais elevado que as de braquiária. Os teores de CHO's das silagens de ambos capins foram influenciados de forma quadrática ($P < 0,05$) pelas doses de N, estimando-se valor máximo de 1,64 % na dose de 52,28 kg N para o capim-mombaça e ponto de mínimo de 1,32% para a dose de 52,30 kg N para o capim-braquiária. O aumento do teor de CHO's com aumento das doses de N observado no capim-mombaça pode ser considerado atípico, sendo, possivelmente, causado por erros metodológicos. A redução na concentração de CHO's com aumento das doses de N também foi observado por Keady et al. (2000) e Namihira (2009), sendo uma possível explicação para uma maior translocação desses CHO's para o crescimento das plantas adubadas. Segundo Corsi (1994), se o nitrogênio aplicado permitir o crescimento da planta, a tendência é de utilização dos carboidratos disponíveis para formar células e protoplasma, em vez de provocar o espessamento das paredes celulares pelo acúmulo desses carboidratos, ocasionando uma redução no teor de CHO's na planta.

3.3. pH, N-NH₃, perdas por efluente e por gases nas silagens

Na Tabela 3, são apresentados os valores médios de pH, amônia (N-NH₃) e das perdas por efluentes e gases nas silagens de capim-mombaça e capim-braquiária adubadas com diferentes doses de nitrogênio. O pH e as perdas por gases foram influenciados ($P < 0,05$) apenas por espécies forrageiras. Para os teores de N-NH₃ e perdas por efluentes, observou-se efeito da interação ($P < 0,05$) espécie forrageira x

doses de N. Observou-se maior valor de pH na silagem de capim-mombaça em relação à de braquiária (4,91 x 4,50). Isso se deve, provavelmente, ao menor teor de CHO's no capim mombaça, quando comparado à braquiária (3,04 x 3,64%), embora essa diferença seja de pouca magnitude. O teor de CHO's suporta o crescimento de BAL, que produzem ácido láctico, principal ácido responsável pelo rápido abaixamento do pH. Os elevados valores de pH nessas silagens são indicativos de fermentações indesejáveis causada, principalmente, por bactérias do gênero *clostridium*, que tem seu crescimento favorecido em silagens com baixo teor de MS. A elevação do pH ocorre principalmente pelo aumento do poder tampão causado pela proteólise, que libera amônia e dificulta a queda do pH. Além disso, as *clostridium* competem por substratos com as BAL, diminuindo a produção do principal ácido responsável pela queda do pH (McDonald et al. 1991). É fato reconhecido que silagens de gramíneas tropicais estabilizam em pH mais elevado. No entanto, o pH, isoladamente, não pode ser considerado como critério seguro para avaliação de silagens, pois seu efeito inibidor sobre as bactérias e enzimas das plantas depende da velocidade do declínio, da concentração iônica e do grau de umidade do meio.

Tabela 3 - Valores médios de pH, amônia, das perda por efluente e perda por gases das silagens

Silagens	Doses de Nitrogênio (kg/ha)					CV (%)
	0	30	60	90	Médias	
	pH					2,97
Mombaça	4,77	4,86	5,04	4,98	4,89a	
Braquiária	4,58	4,38	4,62	4,48	4,51b	
	N-NH ₃ (% N total)					23,59
Mombaça	9,98a	10,96a	20,75a	16,72a	14,60	
Braquiária	11,82a	10,87a	12,30b	11,47b	11,61	
	Efluente (Kg/ton MN)					12,08
Mombaça	15,70a	19,59a	78,39a	42,85a	39,13	
Braquiária	15,67a	13,46b	15,79b	19,93b	16,21	
	Gases (%MS)					48,43
Mombaça	4,64	3,01	4,76	6,26	4,67a	
Braquiária	2,96	3,44	3,61	2,77	3,19b	
Equação de Regressão						
	N-NH ₃					R ²
Mombaça	$\hat{Y} = 8,846 + 0,225408X - 0,001393X^2$					66,71
	Efluente					R ²
Mombaça	$\hat{Y} = 8,236125 + 1,453287X - 0,010953X^2$					55,2

* Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem (P<0,05) pelo teste “F”.

Avaliando-se o efeito de dose de N dentro de espécie forrageira, constata-se maiores teores de N-NH₃ nas silagens de capim-mombaça adubadas com 60 e 90 kg N ha⁻¹. Observou-se efeito quadrático para o capim-mombaça, avaliando-se capim dentro de doses com valor máximo de 20,00 % N-NH₃, na dose de 80,9 kg N. Mahanna (1994) estabeleceu que silagens de gramíneas e leguminosas com teores de N-NH₃ (%N total) de 10-15% são consideradas de boa qualidade. Com base nesses critérios, constata-se que apenas as silagens de capim-mombaça adubada com 60 e 90 kg N ha⁻¹ apresentam valores de N-NH₃ superior aos preconizados por Mahanna (1994). Isso se justifica, provavelmente, pelo baixo teor de MS dessas silagens, que

pode ter favorecido o desenvolvimento de microrganismos proteolíticos, pois segundo Muck (1987), taxas de proteólises na formação de nitrogênio amoniacal são superiores em silagens com reduzido teor de MS.

Observou-se maior ($P < 0,05$) produção de efluentes nas silagens de capim-mombaça de plantas adubadas com N. O desdobramento do capim-mombaça nas doses de N ajustou-se a um modelo quadrático, com valor máximo de $56,44 \text{ kg t}^{-1}$ na dose de $66,34 \text{ kg N}$. A possível causa é o menor teor de MS dessas silagens, que favoreceu a produção de efluente. No entanto, esse comportamento não está completamente esclarecido, uma vez que as plantas de ambas as espécies apresentaram teores de MS muito próximos. Destaca-se, também, que ambas as espécies, nas diferentes doses de N avaliadas, apresentaram teores de MS inferiores aos 25% preconizados por McDonald et al. (1991) para uma boa fermentação e redução das perdas por efluentes. Bernardes et al. (2008) encontraram perdas por efluente de $68,5 \text{ kg t}^{-1}$ em silagem de capim-marandu com 17,8% de MS, enquanto Pereira et al. (2006) observou perdas de $35,3 \text{ kg t}^{-1}$ em silagem de capim-mombaça com 21,24% de MS. Outro fator com influência na produção de efluente é a pressão aplicada para compactação (Loures et al., 2003).

Foi observada maior ($P < 0,05$) perda por gases na silagem de capim-mombaça, em relação à de braquiária ($4,67 \times 3,19\%$). Essas perdas estão associadas ao tipo de fermentação ocorrida no processo. Quando a fermentação ocorre via bactérias homofermentativas, utilizando a glicose como substrato para produzir ácido láctico, as perdas são inferiores. Quando esse processo se dá via citrato ou malato, ocorre produção de CO_2 e álcool (etanol e manitol), e as perdas por gases são consideráveis. Esse tipo de fermentação é realizado por bactérias heterofermentativas, enterobactérias e leveduras (McDonald et al, 1991). Os valores encontrados no presente estudo se encontram dentro da faixa de 2,4 a 8,5 % na MS, registrados na literatura nacional em artigo de revisão feito por Zopollatto et al. (2009).

3.4. Isolamento e Caracterização de *Lactobacillus* spp.

Observa-se na Tabela 4 que todos os isolados apresentaram reação negativa ao teste da enzima catalase e positivo para o teste de gram. Nenhum dos isolados cresceu em pH 9,6, porém todos cresceram nas temperaturas de 15°C e 45°C.

Variedades de BAL, incluindo *Leuconostoc mesenteroides* são comumente encontradas em culturas de plantas (Mundt et al, 1967; Mundt 1970). Sob condições microaerófilas, uma fermentação heterolática é realizada. Glicose e outras hexoses são convertidas para equimolares quantidades de D-lactato, etanol e CO₂ pela combinação das vias hexose monofosfato e pentose fosfato (Demoss et al, 1951; Garvie 1986; Grottschalk, 1986). Guilherme et al. (2009) avaliaram a produção de ácido láctico de *Leuconostoc mesenteroides* em xarope de caju e encontraram valores de 15,5 g L⁻¹ de ácido láctico, sendo comprometida a produção deste em valores de pH abaixo de 4,3.

Segundo Hu (2006), *Pediococcus pentosaceus* apresenta interesse científico pela habilidade em produzir agentes antimicrobianos (bacteriocinas) com perspectivas de serem utilizados na preservação de alimentos.

A espécie *L. fermentum* foi identificada como predominante em plantas de capim-braquiária e capim-mombaça (Tabela 7). Segundo Hounhoigan et al. (1993) e Halm et al. (1996), o *L. fermentum* tem sido encontrado como microrganismo predominante em produtos fermentados de cereais. Calderon et al. (2003) observaram que esse microrganismo tem capacidade de utilizar amido como substrato através da produção de α -amilase, sendo classificados como bactérias ácido lácticas amilolíticas (BALA). Esses microrganismos têm sido isolados de diferentes tipos de alimentos tropicais com alto teor de amido (Nwankwo et al. 1989; Olympia et al. 1995; Morlon-Guyot et al. 1998). Em fermentações naturais, BALA podem aumentar a disponibilidade de carboidratos rapidamente fermentados pela parcial hidrólise do amido, desde que sua α -amilase seja apta para hidrolisar esses grânulos (Rodriguez Sanoja et al., 2000). A associação de *L. fermentum* com *L. buchneri* foi positiva para aumentar a estabilidade aeróbia de silagem com alta umidade (Wang e Nishino,

2009). Adesogan et al. (2003) relataram que espécies de *L. fermentum* inoculadas sozinhas apresentam menor efeito do que quando combinadas com outras espécies. Wang e Nishino (2009) concluíram que *L. fermentum* foi predominante no material não ensilado, enquanto o *L. brevis* e o *L. buchneri* se tornaram predominantes durante o processo de fermentação. Tjandeaatmadja et al. (1994) encontraram quantidades significativas de *L. fermentum* em *Panicum maximum* cv. Hamil.

Em outros estudos, Pereira et al. (2007), avaliando as populações de bactérias do ácido láctico de plantas de capim-elefante cv. Cameroon identificou os isolados como *Lactobacillus casei ssp pseudo plantarum*. Santos (2003) identificou os isolados predominantes em capim-mombaça como *Lactobacillus plantarum*, utilizando-se o perfil de fermentação de carboidratos como critério de identificação. Com base no relato acima, observa-se que ocorre diferença na espécie de BAL dominantes entre as diferentes culturas.

Tabela 4- Morfologia e características bioquímicas das estirpes isoladas do capim-mombaça (M) e capim-braquiária (B) colhidos aos 70 dias de rebrotação

ESTIRPES ISOLADAS										
	B3	B4	B5	B6	M1	M2	M4	M16	M17	M21
TESTES										
FORMA	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO	COCUS	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO	BACILO
GRAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRESCIMENTO EM DIFERENTES pH										
7,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRESCIMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS (T °C)										
15 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabela 5- Perfil de fermentação de carboidratos dos isolados de plantas de capim-mombaça

Açúcares	Estirpes isoladas						L. plantarum
	M17	M1	M4	M21	M2	M16	
Padrão	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-
Erotritol	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	-	+	-	-	+	-	+
Ribose	+	(+)	-	+	+	+	+
D-xilose	-	+	-	-	+	-	-
L-xilose	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
β -metil D-xilose	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	(+)	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Frutose	+	+	-	+	+	+	+
Manose	+	+	-	+	+	+	+
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	+	-	-	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	-	-	+	-	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	+
α -metil D-manosídeo	-	+	-	-	+	-	+
α -metil D glicosídeo	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil-glicosamina	+	+	-	+	+	-	+
Amidalina	(+)	+	-	+	+	(+)	+
Arbutina	(+)	-	-	+	+	(+)	+
Esculina	+	+	-	+	+	+	+
Salicina	(+)	+	-	+	+	(+)	+
Celobiose	+	+	-	+	+	+	+
Maltose	+	-	+	-	-	+	+
Lactose	-	-	+	-	-	-	+
Melibiose	-	-	+	-	-	-	+
Sacarose	+	-	+	+	-	(+)	+
Trealose	+	+	-	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	+
D-rafinose	-	-	+	-	-	-	+
Amido	-	-	-	-	-	-	-
Glicogênio	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-
β -gentibiose	+	+	-	+	+	+	+
D-turanose	-	-	-	-	-	-	+
L-xilose	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatose	-	+	-	-	+	-	-
D-fucose	-	-	-	-	-	-	-
L-fucose	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	+	-	-	+	-	(+)	+
ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-	-
2-cetogluconato	-	-	-	-	-	-	-

⁺ fermentação intensa; - ausência de fermentação; ⁽⁺⁾ fermentação pouco intensa.

Tabela 6- Perfil de fermentação de carboidratos dos isolados de plantas de capim-braquiária

Açúcares	Estirpes isoladas				
	B3	B5	B4	B6	L. plantarum
Padrão	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-
Erotritol	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	-	+	+
Ribose	+	+	-	+	+
D-xilose	-	+	-	-	-
L-xilose	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-
β -metil D-xilose	-	-	-	-	-
Galactose	+	-	+	+	+
Glicose	+	-	+	+	+
Frutose	(+)	+	-	-	+
Manose	(+)	+	-	-	+
L-sorbose	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	+
α -metil D-manosídeo	-	-	+	-	+
α -metil D glicosídeo	+	-	-	-	-
N-acetil-glicosamina	(+)	-	-	-	+
Amidalina	-	-	-	-	+
Arbutina	-	-	-	-	+
Esculina	-	-	-	-	+
Salicina	-	-	-	-	+
Celobiose	-	-	-	-	+
Maltose	+	+	+	+	+
Lactose	(+)	-	-	-	+
Melibiose	+	-	+	+	+
Sacarose	+	-	(+)	+	+
Trealose	+	-	-	-	+
Inulina	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	+
D-rafinose	(+)	-	+	+	+
Amido	+	-	-	-	-
Glicogênio	+	-	-	-	-
Xilitol	+	-	-	-	-
β -gentibiose	+	-	-	-	+
D-turanose	+	-	-	-	+
L-xilose	-	-	-	-	-
D-tagatose	-	-	-	-	-
D-fucose	-	-	-	-	-
L-fucose	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-
Gluconato	+	+	+	-	+
ceto-gluconato	-	-	-	-	-
2-cetogluconato	-	+	-	-	-

⁺ fermentação intensa; - ausência de fermentação; ⁽⁺⁾ fermentação pouco intensa.

Tabela 7- Espécies identificadas pelo teste API 50 CH com as respectivas porcentagens de identificação

Código	Espécies Identificadas	% ID
B4	Lactobacillus fermentum	99,5
B6	Lactobacillus fermentum	96,2
M4	Lactobacillus fermentum	93,7
M16	Lactobacillus paracasei ssp paracasei	80,8
M21	Lactobacillus paracasei ssp paracasei	80,8
M2	Lactobacillus lactis ssp lactis	82,8
B5	Lactobacillus brevis	70,5
M17	Lactobacillus plantarum	94,9
M1	Pediococcus pentosaceus	93,5
B3	Leuconostoc mesenteroides ssp	88,9

Fonte: João Paulo Sampaio Rigueira, 2011.

3.5. Quantificação das populações microbianas

Na forragem fresca foram registradas populações de BAL de 4,69 e 5,65 log UFC g⁻¹ para os capins braquiária e mombaça, respectivamente. Nas silagens, as populações de BAL variaram de 4,95 a 6,95 log UFC g⁻¹ (Tabela 8). Com população de BAL superior nas silagens de capim-mombaça em relação às de braquiária. Os valores de BAL encontrados neste experimento para o capim *in natura* são semelhantes aos observados por Pereira et al. (2006) em capim-mombaça (5,55 log UFC g⁻¹), e inferiores a 5,51 log UFC g⁻¹ verificados por Sousa et al. (2006) em capim-braquiária. Porém, esses valores situam-se dentro do limite de variação observado por Pahlow et al. (2003) para gramíneas de clima temperado. O aumento na população de BAL nas silagens em relação à forragem, antes da ensilagem, é comumente observado na maioria dos estudos com silagens. Esse aumento na população de BAL se deve à reativação de células dormentes e não culturáveis de BAL durante o processo de picagem da forragem (Pahlow et al., 2003).

Muck (1996), sugeriu populações de BAL superiores a 5 log UFC g⁻¹ como mínimo necessário para assegurar boa fermentação da massa ensilada. Verifica-se, que apenas o capim-mombaça atingiu esse valor, podendo assim comprometer o processo de conservação pela menor produção de ácidos, sendo estes, necessários para estabilização

do processo de ensilagem. O baixo teor de CHO's das plantas *in natura*, possivelmente, limitou o crescimento da população de BAL nas silagens. A população de BAL mostrou tendência de diminuição com aumento das doses de N. Esse comportamento difere daquele observado por Brady (1966) e Wilson (1969) que registraram aumento na população de BAL com o incremento das doses nitrogênio. Isso se deve, possivelmente, porque com aumento nas doses de N, aumentam os teores de PB nas gramíneas, incrementando, assim, a disponibilidade de aminoácidos essenciais para o crescimento das BAL (Brady, 1966). O processo de ensilagem é complexo, devido ao grande número de microrganismos envolvidos e pode ser considerado uma metabiose, ou seja, ocorre o desenvolvimento simultâneo e sucessivo de microrganismos de diversos gêneros e espécies, que dependem principalmente do pH, do potencial de oxi-redução e do tipo e quantidade de substratos presente no meio (Pereira et al., 2006). Por isso, a população microbiana da cultura forrageira antes da ensilagem é completamente diferente daquela encontrada na silagem, tanto em número, quanto taxonomicamente.

A quantidade de enterobactérias (ENT) na planta *in natura* não apresentou variação entre as espécies forrageiras, registrando-se valor médio de $7,60 \log \text{ UFC g}^{-1}$. Esse valor assemelha-se ao encontrado por Sousa et al. (2006) em capim-braquiária colhido aos 60 dias de rebrotação ($7,08 \log \text{ UFC g}^{-1}$). A população de ENT mais elevada em relação à de BAL não é desejada, porém, tem sido observada com frequência na literatura (Pahlow et al., 2003; Santos et al., 2006; Pereira et al., 2007). A presença de enterobactérias em silagens não é desejável, pois dada sua natureza anaeróbia facultativa, competem com as BAL por nutrientes antes e após a ensilagem. Além disso, elas são responsáveis pela maior parte da amônia formada a partir da degradação da proteína e da redução de nitrato, favorecendo, assim, o aumento da capacidade tamponante da massa ensilada (Pereira et al., 2006). As enterobactérias são mais sensíveis à queda do pH em relação às BAL, com isso, a presença de ENT na silagem vai depender principalmente do tempo necessário para que as BAL consigam produzir quantidade suficiente de ácido de modo a baixar o pH à valores tóxicos para ENT. Em silagens de boa qualidade, a partir de sete dias de fermentação não se observa população de enterobactérias, já em silagens com alta umidade e baixa concentração de carboidratos solúveis a população de ENT poderá

competir por substrato com BAL por mais de 30 dias de fermentação (Luis e Ramirez, 1988). Como os silos foram abertos 90 dias após a fermentação, não foi detectado população de ENT.

A população de fungos e leveduras foi semelhante entre os capins na forma *in natura*. Observou-se queda na população de fungos e leveduras durante o processo de fermentação em ambas as espécies forrageiras, com valores médios de 2,08 e 2,16 log UFC g⁻¹ em silagens de capins braquiária e mombaça, respectivamente. Esses valores são próximos aos encontrados por Pereira et al. (2007) em silagem de capim-elefante (3,25).

Tabela 8 - Quantificação de bactérias ácido láctica (BAL), enterobactérias, fungos e leveduras do capim-mombaça e capim-braquiária *in natura* e das respectivas silagens

Antes da ensilagem	BAL	Enterobactérias (log UFC g ⁻¹)	Fungos e Leveduras
Braquiária	4,69	7,55	3,65
Mombaça	5,65	7,65	3,39
Doses de N		Silagem de Braquiária	
0	5,39	ND	2,00
30	5,57	ND	2,00
60	5,23	ND	2,17
90	4,95	ND	2,17
		Silagem de Mombaça	
0	6,70	ND	2,30
30	6,95	ND	1,74
60	5,95	ND	2,30
90	6,17	ND	2,30

ND – não detectado.

4. Conclusões

Lactobacillus fermentum é a espécie de bactéria láctica predominante em plantas de capim-mombaça e capim-braquiária, com base em testes bioquímicos.

A adubação nitrogenada reduz o teor de matéria seca e de carboidratos solúveis nas silagens de ambas forrageiras sem, contudo, comprometer o perfil fermentativo das silagens.

Referências Bibliográficas

ADESOGAN, A.T., SALAWU, M.B., ROSS, A.B., DAVIES, D.R., BROOKS, A.E. Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* inoculants, or a chemical additive on the fermentation, aerobic stability, and nutritive value of crimped wheat grains. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1789–1796, 2003.

AGRIPOINT. 2007. Pesquisa Top BeefPoint de confinamentos: Os 50 maiores confinamentos do Brasil em 2006. http://wm.agripoint.com.br/imagens/banco/beefpoint/Top50_2006_07.pdf

AMARAL, R.C; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R. et al. Características fermentativas e químicas de silagens de capim-marandu produzidas com quatro pressões de compactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.36, p. 532-539. 2007.

ÁVILA, C.L.S.; PINTO, J.C.; FIGUEIREDO, H.C.F.; MORAIS, A.R.; PEREIRA, O.G.; SCHWAN, R.F. Estabilidade aeróbica de silagens de capim-mombaça tratadas com *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.5, p.779-787, 2009.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: S. Salminen and A. Von Wright (eds). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc, New York, p. 1-72, 1998.

BALSALOBRE, M.A.A.; NUSSIO, L.; MARTHA JÚNIOR, G.B. Controle de perdas na produção de silagem em gramíneas tropicais. In: MATTOS, W.R.S.; FARIA, V.P.; DA SILVA, S.C. et al. (Ed.). SIMPÓSIO “A PRODUÇÃO ANIMAL NA VISÃO DOS BRASILEIROS”. Piracicaba: FEALQ, 2001. 927p.

BERGAMASCHINE, A.F.; ISEPON, O.J., GUATURA, A.S. et al. Efeitos da adição de resíduo de milho e da cultura enzimo-bacteriana sobre qualidade da silagem do capim Tanzânia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. (CD-ROOM).

BERGAMASCHINE, A.F.; PASSIPIÉRI, M.; VERIANO FILHO, W.V., et al., Qualidade e valor nutritivo de silagens de capim-marandu (*B. Brizantha* cv, Marandu) produzidas com aditivos ou forragem emurchecida. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1454-1462, 2006.

BERNARDES, T.F.; REIS, R.A.; AMARAL, R.C. et al. Perfil fermentativo, estabilidade aeróbica e valor nutritivo de silagens de capim-marandu ensilado com aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.10, p.1728-1736, 2008.

BERNARDES, T.F.; REIS, R.A.; SIQUEIRA, G.R. et al. Estabilidade aeróbica da ração total e de silagens de capim-Marandu tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p.754-762, 2007.

BODDEY, R.M.; MACDO, R.; TARRÉ, R.M.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O.C. de.; REZENDE, C. De P.; CANTARUTTI, R.B.; PEREIRA, J.M.; ALVE, B.J.R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in Brachiaria pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.103, p.389-403, 2004.

BRADY, C. J. On the nitrogen nutrition of silage strains of lactic acid bacteria. **Aust J Biol Sci**. Feb; v.19, n.1, p. 105-22, 1996.

CALDERON, M; LOISEAU, G; GUYOT, J.P. Fermentation by *Lactocillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals: consequences on growth energetic and α -amylase production. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.161-169, 2003.

CENSO AGROPECUÁRIO. Censos econômicos de 1985. Rio de Janeiro. IBGE, 1992. 399p.

CEZARIO, A.S. **Perdas na ensilagem e desempenho de bovinos de corte suplementados com dietas contendo silagem de capim-marandu em duas idades de rebrotação com inoculante bacteriano**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2011.

COAN, R.M.; VIEIRA, P.F.; SILVEIRA, R.N. Inoculante enzimático-bacteriano, composição química e parâmetros fermentativos das silagens dos Tanzânia e Mombaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 416-424, 2005.

COAN, R.M.; VIEIRA, P.F.; SILVEIRA, R.N.; PEDREIRA, M.S.; REIS, R.A. Efeitos do inoculante enzimático-bacteriano sobre a composição química, digestibilidade e qualidade das silagens dos capins Tanzânia e Mombaça. In: XXXVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/USP – PIRACICABA, 2001. P. 124-126.

COLOZZA, M.T. **Rendimento e diagnose foliar dos capins Aruana e Mombaça cultivados em Latossolo Vermelho-Amarelo**. Piracicaba, 1998. 127p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

CORRÊA, L.A., POTT, E.B., CORDEIRO, C.A. Integração de pastejo e uso de silagem de capim na produção de bovinos de corte. In: Simpósio de Produção de Gado de Corte. 2., 2001, Viçosa, MG, **Anais...** Viçosa: UFV, DZO, 2001. p.174.

CORSI, M. Adubação nitrogenada das pastagens. In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J.C. de; FARIA, V.P. de (Ed.). **Pastagens: fundamentos da exploração racional**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1994. p. 121-155.

De FARIA, V.P. **Efeito da maturidade da planta e diferentes tratamentos sobre a ensilagem do capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum), variedade napier**. Tese de Doutorado apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP. 1971.

De MAN, J.C., M. ROGOSA., M.E. SHARPE. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. Applied Bacteriol.**, v. 23 p.130-135, 1960.

DEMOSS, R. D., R. C. BARD., I. C. GUNSALUS. The mechanism of heterolactic fermentation: a new route of ethanol formation. **J. Applied Bacteriol.** v. 62, p. 499-511, 1951.

DIETZ, K.J; HOLLENBACH, B; HELLWEGE, E. The epidermis of barley leaves is a dynamic intermediary storage compartment of carbohydrates, amino acids and nitrate. **Physiol Plant**, v.92, p.31-36, 1994.

FERREIRA, D.F. Sistema de análises de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 2000. (**SISVAR** 4. 1. Pacote computacional).

FRICKE, W, LEIGH, R.A, TOMOS, A.D. Concentrations of inorganic and organic solutes in extracts from individual epidermal, mesophyll and bundle sheath cells of barley leaves. **Planta**, v.192, p.310–316, 1994.

GARVIE, E. I. **Genus *Leuconostoc*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***. eds. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. Baltimore, MD: The Williams and Wilkins Co, 1986.

GARVIER, E.I. Genus *Pediococcus*, pp. 1075-1079. In, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol 2, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.

GOMIDE, J.A., COSTA, G.C. Adubação nitrogenada e consorciação de capim-colonião e capim-jaraguá. III – Efeitos de níveis de nitrogênio sobre a composição mineral e digestibilidade da matéria seca das gramíneas. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.13, n.2, p. 215-224, 1984.

GOTTSCHALK, G. 1986. **Bacterial Metabolism**. 2nd ed. New York: Springer-Verlag.

GUILHERME, A.A.; PINTO, G.A.S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29 n.4, p-738-743, 2009.

HALM, M., OSEI-YAW, A., HAYFORD, A., KPODO, K.A., AMOA-AWUA, W.K.A. Experiences with the use of a starter culture in the fermentation of maize for “kenkey” production in Ghana. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p. 531-536, 1996.

HOUNHOUIGAN, D.J., NOUT, M.J.R., NAGO, C.M., HOUBEN, J.H., ROMBOUTS, F.M., 1993. Composition and microbiological and physical attributes of maws a fermented maize dough from Benin. **International Journal of Food Science & Technology**, v.28, p.513 – 517, 1993.

HU, YONGJIN, XIA, WENSHUI., GE, CHANGRONG. Effect of mixed starter cultures fermentation on the characteristics of silver carp sausages. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.7, p.1-11, 2006.

KEADY T.W.J., MAYNE C.S. The effects of nitrogen fertilizer, harvest date and additive treatment on fermentation, in-silo losses and predicted feeding value of grass silage. **Proceedings of the XI International Silage Conference**, Aberystwyth, Wales, p. 52-53, 1996.

KEADY T.W.J., O'KIELY P. An evaluation of the effects of rate of nitrogen fertilization of grassland on silage fermentation, in-silo losses, effluent production and aerobic stability. **Grass and Forage Science**, v.51, p.350- 362, 1996.

KEADY T.W.J., MURPHY J.J., FITZGERALD S. The effects of level of nitrogen fertilizer application to silage swards on subsequent silage composition, intake and animal performance of lactating dairy cattle. **J. Animal Science**, v.60, p. 515, 1995.

KEADY, T. W. J., O'KIELY, P. An evaluation of potassium and nitrogen fertilisation and date of harvest on fermentation, effluent production, dry matter recovery and predicted feeding value of silage. ***Grass and Forage Science*** v.53, p.326-337, 1998.

KEADY, T. W. J., O'KIELY, P. An evaluation of the effects of rate of nitrogen fertilization of grassland on silage fermentation, in-silo losses, effluent production and aerobic stability. ***Grass and Forage Science***, v.51 p.350-362, 1996.

KEADY, T. W. J., MAYNE, C. S., FITZPATRICK, D. A. Prediction of silage feeding value from the analysis of the herbage at ensiling and effects of nitrogen fertilizer, date of harvest and additive treatment on grass silage composition. ***Journal of Agricultural Science, Cambridge***, v.134, p. 353-368, 2000.

KUNG JR., L.; SATTER, L.D.; JONES, B.A. et al. Microbial inoculation of low moisture alfalfa silage. ***Journal of Dairy Science***, v.70, n.10, p.2069-2077, 1987.

LOURES, D.R.S; GARCIA, R; PEREIRA, O.G; CECON, O.R; SOUZA, A.L. Características do efluente e composição químico-bromatológica da silagem de capim-elefante sob diferentes níveis de compactação. ***Revista Brasileira de Zootecnia***, v.32, n.6, p.1851-1858, 2003.

LUIZ, L.; RAMIREZ, M. Evolución de la flora microbiana en ensilaje de king grass. ***Pastos y Forrajes***, v.11, p.249-253, 1988.

McDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. ***The biochemistry of silage***. Marlow Bucks: Chalcombe Publications, 1991. 340p.

MORLON-GUYOT, J., GUYOT, J.P., POT, B., JACOB de HAUT, I., RAIMBAULT, M. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, v.48, p. 1101 – 109, 1998.

MUCK, R. E. Dry matter level affects alfalfa silage quality: Nitrogen transformations. Trans. ***ASAE***, p. 30-37, 1987.

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

MUNDT, J. O. Lactic Acid Bacteria Associated with Raw Plant Food Material. **J. Milk Food Technol.**, v.33, p.550-553, 1970.

MUNDT, J. O., W. F. GRAHAM, and I. E. McCARTY. Spherical Lactic Acid Producing Bacteria of Southern-Grown Raw and Processed Vegetables. **Appl. Microbiol.**, v.15, p.1303-1308, 1967.

NAMIHIRA, T.; SHINZATO, N.; AKAMINE, H.; MAEKAWA, H.; MATSUI, T. Influence of nitrogen fertilization on tropical-grass silage assessed by ensiling process monitoring using chemical and microbial community analyses. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p.1954-1965, 2009.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Biochemistry**, Washington, v. 153, p. 375-380, 1944.

NWANKWO, D., ANADU, E., USORO, R. Cassava-fermenting organisms. **MIRCEN Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.5, p.169 – 179, 1989.

OKUDA, H.; FUJI, S.; KAWASHIMA, Y. A direct colorimetric method for blood ammonia. **Tokushima Journal Exp. Medicine.**, v.12, p.11-13, 1965.

OLYMPIA, M., FUKUDA, H., ONO, H., KANEKO, Y., TAKANO, M. Characterization of starch-hydrolysing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, Burong Isda» and its amylolytic enzyme. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80, p.124 – 130, 1995.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. Microbiology of ensiling. In: SILAGE SCIENCE AND TECHNOLOGY. Madison. **Proceedings...** Madison: ASCSSA-SSSA, Agronomy, v.42, p. 31-93, 2003.

PEDREIRA, C. G. S.; MELLO, A. C. L.; OTANI, L. O processo de produção de forragem em pastagens. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. p. 772-807.

PEREIRA, O.G.; ROCHA, K.D.; FERREIRA, C.L.F. Composição química, caracterização e quantificação da população de microrganismos em capim-elefante cv. Cameroon (Pennisetum purpureum, Schum.) e suas silagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1742-1750, 2007.

PEREIRA, O.G.; SANTOS, E.M. Microbiologia e o processo de fermentação em silagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 3., 2006. Viçosa. **Anais...** UFV; DZO, 2006.

PEREIRA, O.G.; SANTOS, E.M.; FERREIRA, C.L.L.F. et al. Populações microbianas em silagem de capim-mombaça de diferentes idades de rebrotação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: UFPB, 2006. CD-ROM. Forragicultura.

PRITCHARD, G. C., COOLBEAR, T. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Reviews** v.12, p. 179 - 206, 1993.

REITER, B., ORAM, J.D. Nutritional studies on cheese starters. I. Vitamins and aminoacids requirements of single strain starters. **Journal of Dairy Research**, v.29, p. 63 – 77, 1962.

RIBEIRO, J.L.; NUSSIO, L.G.; MOURÃO, G.B.; MARI, L.J.; ZOPOLLATTO, M.; PAZIANI, S.F. Valor nutritivo de silagens de capim-Marandu submetidas aos efeitos de umidade, inoculação bacteriana e estação do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.7, p.1176-1184, 2008.

RIBEIRO, K.G. **Rendimento forrageiro e valor nutritivo do cpim-elefante “Anão”, sob cinco doses de nitrogênio, ao atingir 80 e 120 cm de altura.** Viçosa, MG: UFV, 1995. 60p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

RODRIGUEZ SANOJA, R., MORLON-GUYOT, J., JORE, J., PINTADO, J., JUGE, J., GUYOT, J.P. Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase and the role of the C-terminal direct repeats in raw starch binding. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3350 – 3356, 2000.

SANTOS, E.M. **Populações microbianas e perfil fermentativo em silagens de capins tropicais e desempenho de bovinos de corte alimentados com dietas contendo silagens de capim-mombaça.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 126p . Tese (Doutorado).

SANTOS, E.M.; PEREIRA, O.G.; ROSA, L.O. Perfil fermentativo e composição bromatológica de silagens de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* cv. Basilisk) de diferentes idades de rebrotação. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 44., 2007, Jaboticabal. **Anais...** SBZ, 2007.

SCHMIDT, P. **Perdas fermentativas na ensilagem, parâmetros digestivos e desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo silagem de cana-de-açúcar.** Piracicaba, SP: ESALQ, 2006. 228p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

SILVA, D.J.; QUEIRÓZ, A.C. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos.** 3 ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.

SILVEIRA, A.C. Técnicas de produção de silagem. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 2., 1975, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1975. p. 156-180.

SIMPSON, W.J., H. TAGUCHI. The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. In, B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (eds). **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** Chapman & Hall, London, p. 125-172, 1995.

SOUZA, L.O., SANTOS, E.M., PENTEADO, D.C.S. et al. Composição bromatológica de silage de capim-mombaça inoculada com *Lactobacillus plantarum* da microflora epifítica. IN: CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA- ZOOTEC, 6., 2006. Recife. **Anais...** Recife: UFRPE 2006. CD-ROM.

TJANDRAATMADJA, M.; NORTON, B.W.; MAC RAE, I.C. Ensilage characteristics of three tropical grasses as influenced by stage of growth and addition of molasses. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.10, p.74-81, 1994.

TOMICH, T. R.; PEREIRA, L. G. R.; GONÇALVES, L. C. et al. Características químicas para avaliação do processo fermentativo de silagens: uma proposta para qualificação da fermentação. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, 2003. 20p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, N, J. B. **Analysis of forages and fibrous food.** 1 ed. Ithaca: Cornell University, 1985, 202p.

VILELA, D. Aditivos para silagem de plantas de clima tropical. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. P. 73-108.

WILMAN, D. Nitrogen and Italian ryegrass. 1. Growth up to 14 weeks: dry matter yield and digestibility. **Grass and Forage Science**., v.30 p.141-147, 1975.

WILMAN, D.; KOOCHKEI, A.; LWOGA, A.B. The effect of interval between harvests and nitrogen application on the proportion and yield of crop fractions and on the digestibility and digestible yield and nitrogen content and yield of two perennial ryegrass varieties in the second harvest year. **J. Agric. Sci.**, v. 87 p.59-74, 1976.

WILSON, R.K. Effects of fertilizer N, additives and season on silage fermentation in laboratory silos. **Irish Journal of Agricultural Research**, v.8, p.307-318, 1969.

WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984, 322p.

ZOPOLLATTO, M; DANIEL, J.L.P; NUSSIO, L.G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.38, p.170-189, 2009.

ARTIGO 2 - COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA, POPULAÇÕES MICROBIANAS, PERFIL FERMENTATIVO E RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA SECA EM SILAGENS DE CAPIM-MARANDU COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ESTILOSANTES CV. CAMPO GRANDE TRATADAS COM INOCULANTE MICROBIANO

Resumo

Avaliou-se a composição bromatológica, o perfil fermentativo, a população microbiana e a recuperação de matéria seca de silagens de capim-marandu contendo diferentes níveis de estilosantes cv. Campo Grande tratadas ou não com inoculante microbiano. Os níveis de estilosantes utilizados foram 0, 10, 20 e 30% do peso na matéria natural da massa ensilada. O capim-marandu foi colhido aos 70 dias de rebrotação e o estilosantes no estágio de pré-florescimento. O inoculante microbiano usado foi o Sil All C4 (Altech do Brasil). O material foi ensilado em silos laboratoriais de 20 kg de capacidade, dotados de válvulas de bunsen. Foi usado um esquema fatorial 4 x 2 (quatro níveis de estilosantes, com e sem inoculante microbiano) em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Observou-se o efeito de interação ($P < 0,05$) entre níveis de estilosantes e inoculante microbiano sobre os teores de matéria seca, perdas por efluente, recuperação de matéria seca e população de fungos e leveduras. O teor de MS das silagens com e sem inoculante aumentaram linearmente com a adição de estilosantes ao capim-marandu. O teor de PB aumentou e o de FDN decresceu linearmente com o incremento dos níveis de estilosantes. O pH e o teor de $N-NH_3$ foram afetados apenas pelo nível de estilosantes. Estimou-se valor máximo de pH de 4,16 para o nível de 12,25% de estilosantes. Observou-se efeito de inoculante e de período de fermentação sobre a população de bactérias do ácido láctico. Não se observou efeito de inoculante, níveis de estilosantes, nem da interação destes sobre a perda por gases. A recuperação de MS aumentou linearmente com a adição de estilosantes, na silagem sem inoculante. Na silagem inoculada, estimou-se máxima recuperação de MS no nível de 17% de estilosantes. Conclui-se que o consórcio de capim-marandu com estilosantes melhora a composição bromatológica, o perfil fermentativo, além de diminuir as perdas de matéria seca das silagens.

Palavras-chaves: Inoculante microbiano, leguminosas, braquiária, silagem

Abstract

In this experiment were evaluated chemical composition, the fermentation profile, the microbial population and the dry matter recovery in marandu grass silage containing different levels of estilosantes cv. Campo Grande treated or not with inoculant. Estilosantes levels used were 0, 10, 20 and 30% by weight in natural matter ensiled mass. The marandu grass was harvested at 70 days of regrowth and the estilosantes at the pre-flowering. The inoculant used was Sil All C4 (Alltech Brazil). The material was ensiled in laboratory silos of 20 kg capacity, equipped with valves of bunsem. Was used a 4 x 2 factorial arrangement (for levels of estilosantes, with or without inoculant) in a completely randomized design with four replications. There was interaction effect ($P < 0.05$) between levels of inoculant and estilosantes levels on the dry matter, effluent losses, dry matter recovery and population of fungi and yeasts. The DM content of silage with and without inoculant increased linearly with the addition of the estilosantes in the marandu grass silage. The CP content increased linearly with increasing levels of estilosantes while the NDF content decreased linearly with increasing levels of estilosantes. The pH and $\text{NH}_3\text{-N}$ content was affected only by level of estilosantes. It has been estimated maximum value of pH equal to 4.16 for the level of 12.25% of estilosantes. Was observed effect of inoculant and fermentation period on the population of lactic acid bacteria. There was no effect of inoculant, estilosante levels, any the interaction of theses on the mass loss. The recovery of DM increased linearly with the addition of estilosantes, in the silage without inoculant. In the inoculated silage was estimated maximum recovery of DM in the level of 17% of the estilosantes in the silage. Conclude that the consortium marandu grass with estilosantes improves the chemical composition, the fermentation, and reduce losses of dry matter in the silages.

Keywords: microbial inoculants, legumes, braquiaria, silage

1. Introdução

Estima-se que a área total de pastagem no Brasil seja de 220 milhões de hectares, sendo 80 milhões com pastagens nativas e 140 milhões com pastagens cultivadas (Vilela et al., 2004). Dentre as espécies cultivadas, destaca-se a predominância de gramíneas dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum*. Segundo Macedo (2005), a participação relativa de espécies do gênero *Brachiaria* na região do cerrado é de 85%, e de espécies do gênero *Panicum*, da ordem de 12%. Apesar da grande extensão territorial das pastagens, tem-se observado diminuição na produtividade, causada principalmente pela redução na fertilidade do solo. A falta de reposição de nutrientes e, ou, manejo inadequado adotado pelos pecuaristas faz com que grande parte dessas pastagens apresentem-se em estágio de degradação. Embora se reconheça a importância da adubação nitrogenada como forma de conter o processo de degradação das pastagens e assegurar a sua persistência, o seu uso está se tornando proibitivo devido à elevação dos preços. Segundo USDA (2010), o custo da tonelada de uréia passou de U\$ 103, na década de 60, para U\$ 339, na última década. Devido ao alto custo dos fertilizantes nitrogenados, pesquisadores e pecuaristas têm buscado alternativas viáveis para manter a fertilidade dos solos e, dentre essas tecnologias, a utilização de pastos consorciados com leguminosas tem merecido destaque, especialmente com aquelas do gênero *Stylosanthes* (Edye et al. 1984; Andrade e Karia, 2000).

Dentre as vantagens do consórcio com leguminosas podemos destacar o aumento do valor nutritivo da dieta, melhoria na produção animal e efeitos indiretos relacionados com o aporte de nitrogênio ao ecossistema pastagem. Considerando que a estacionalidade da produção de forragem no período “seco” do ano, que compreende os meses de maio a setembro no Brasil central, seja a principal responsável pelos baixos índices produtivos da pecuária brasileira, alternativas devem ser buscadas com o intuito de suplementar esse déficit de nutrientes, uma vez que as exigências dos animais se mantêm constantes durante todo o ano. Dentre as alternativas de conservação de forragem destacam-se a fenação e a ensilagem do excedente de forragem produzido no período das águas. Recentemente, a utilização de silagens de leguminosas tem despertado

interesse entre os produtores (Pereira et al., 2009). No entanto, as leguminosas, apesar do alto valor nutritivo, em geral, apresentam características indesejáveis para o adequado processo de fermentação, tais como alto teor de umidade no momento do corte, alto poder tampão, baixos teores de carboidratos solúveis e caule tubular oco, que impede a completa retirada do ar no momento da ensilagem (Mc Allister et al., 1998). Adicionalmente, devido ao maior teor de proteína bruta das leguminosas em relação às gramíneas, normalmente apresenta elevada extensão de proteólise no processo de ensilagem. No entanto, apesar desses aspectos negativos, o avanço tecnológico no processo de ensilagem tem mostrado a possibilidade de ensilagem de leguminosas como culturas exclusivas (Pereira et al., 2009).

Acredita-se também, que esses problemas podem ser minimizados com a ensilagem de pastos mistos em países de clima temperado, notadamente naqueles da comunidade européia. Considerando-se a escassez de informações sobre a ensilagem mista de gramíneas e leguminosas, conduziu-se o presente estudo com vistas a avaliar a qualidade e as perdas das silagens de capim-marandu consorciada com diferentes proporções de estilosantes inoculadas ou não com aditivo microbiano. Os níveis de estilosantes adotados visam simular pastos consorciados contendo baixa, média e adequada participação da leguminosa no pasto.

2. Material e Métodos

2.1. Local e condições climáticas

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizada no município de Viçosa-MG, entre os meses de novembro de 2010 e maio de 2011. A cidade de Viçosa está situada a 20° e 45' de latitude sul, 42° e 51' de longitude oeste e 657 m de altitude, apresentando precipitação anual de 1341 mm, dos quais cerca de 86% ocorrem nos meses de outubro a março. Foi utilizado um pasto de capim-marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) e outro de *Stylosanthes* cv. Campo Grande.

2.2. Manejo do capim-marandu

Antes do início do experimento, foi feito um corte de uniformização da área, que media 140 m², utilizando-se uma roçadeira costal. Em seguida, foi feita uma adubação de cobertura com 300 kg ha⁻¹ da mistura 20-05-20. A forragem foi colhida aos 70 dias de rebrotação, sendo cortada a 5 cm do solo com auxílio de uma roçadeira costal.

2.3. Manejo dos estilosantes cv. Campo Grande

O estilosante foi proveniente de uma área de 1000 m², cujo primeiro corte foi efetuado em agosto de 2010. O segundo corte dos estilosantes, correspondente à rebrota, foi realizado em dezembro do mesmo ano, quando as plantas encontravam-se em plena fase de florescimento, sendo cortado a 5 cm do solo com o auxílio de cutelos.

2.4. Ensilagem

Após o corte, ambas as forrageiras foram picada em máquina ensiladora estacionária em partículas de, aproximadamente, 2 cm. Inicialmente, foi picado o capim-

marandu e, em seguida, o estilosantes. Em seguida, efetuou-se a pesagem das forragens, adicionando-se as seguintes proporções de estilosantes no capim-marandu: 0 (controle), 10, 20 e 30 % do peso na matéria natural, a fim de simular os pastos consorciados. O inoculante microbiano Sil All C4 (Allteh do Brasil) foi aplicado com auxílio de um pulverizador manual, com capacidade de 250 mL, naqueles tratamentos que receberam inoculante. A dosagem utilizada foi a recomendada pelo fabricante, na seguinte proporção: 250 g de inoculante diluídos em 50 L de água para 50 toneladas de forragem verde. O inoculante microbiano utilizado contém os seguintes níveis de garantia: *Lactobacillus plantarum* (10 bilhões UFC/g), *Pediococcus acidilactici* (1 bilhão UFC/g), *Enterococcus faecium* (10 bilhões de UFC/g), uma composição básica de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas e dextrose 80%.

A ensilagem das diferentes misturas de capim:leguminosa foi feita em silos experimentais (baldes plásticos) com capacidade de 20 L, dotados de válvula de Bunsen adaptadas em suas tampas para permitir o escape dos gases oriundo da fermentação. No fundo dos silos foram colocados 4 kg de areia seca em um saco de pano, para posterior estimativa da produção de efluente. Os silos foram pesados no momento do fechamento e na abertura, para quantificação das perdas por gases. No momento do fechamento, todos os baldes foram vedados com fita adesiva e armazenados em área coberta, em temperatura ambiente, por 60 dias.

2.5. Delineamento experimental

Utilizou-se um esquema fatorial 4 x 2 (4 níveis de estilosante x com e sem inoculante), em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. As proporções de estilosantes na massa ensilada foram de 0, 10, 20 e 30% do peso total na matéria natural.

2.6. Avaliação das perdas e amostragem das silagens

As perdas por gases e efluente e a recuperação de matéria seca foram estimadas segundo técnicas descritas por Schmidt (2006). As perdas por gases foram calculadas baseando-se na diferença de peso da massa de forragem seca pela seguinte equação:

$$G = (PCI - PCF) / (Mfi \times Msi) \times 10.000, \text{ onde:}$$

G: perdas por gases (%MS);

PCi: peso do balde cheio no fechamento (kg);

PCf: peso do balde cheio na abertura (kg);

MFi: massa de forragem no fechamento (kg);

MSi: teor de matéria seca da forragem no fechamento

As perdas por efluente foram calculadas pela diferença de peso da areia relacionada à massa de forragem no fechamento dos silos.

$$E = [(PVf - Tb) - (Pvi - Tb)] / Mfi \times 1000, \text{ onde:}$$

E: produção de efluente (kg/ tonelada de MS)

PVi: peso do balde vazio + peso da areia no fechamento (kg);

PVf: peso do balde vazio + peso da areia na abertura (kg);

Tb: tara do balde;

MFi: massa de forragem no fechamento (kg).

O índice de recuperação de matéria seca (RMS) foi obtido pela diferença de peso da massa de forragem no momento da ensilagem e da abertura dos silos e seus respectivos teores de MS, segundo a seguinte equação:

$$RMS = (MFf \times MSf) / (MFi \times MSi) \times 100, \text{ onde:}$$

RMS: taxa de recuperação de matéria seca (%);

MFi: massa de forragem no fechamento (kg);

MSi: teor de matéria seca da forragem no fechamento (%);

MFf: massa de forragem na abertura (kg);

MSf: teor de matéria seca da forragem na abertura (%).

2.7. Análises de pH e N-NH₃

Na abertura dos silos, 25 g de silagem de cada balde foram homogeneizados em 225 mL de água destilada, utilizando-se liquidificador por 1 minuto. Em seguida, efetuou-se a leitura do pH no extrato aquoso, utilizando-se potenciômetro. Em 200 mL de solução de H₂SO₄, 2 N, foram colocados 25 g de silagem, permanecendo em repouso na geladeira por 48 h; após filtragem em papel de filtro, foi feita a determinação do nitrogênio amoniacal, segundo procedimentos descritos por Bolsen et al. (1992).

2.8. Análises laboratoriais

Foram colhidos, aproximadamente, 300 g de amostra de silagem de cada silo experimental e das plantas antes da ensilagem. Essas amostras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada, a 60°C, durante 72 horas, moídas em moinho de faca tipo “Willey”, com peneira de 1 mm e armazenadas em recipientes de vidro, devidamente vedados, para determinação de matéria seca (MS); cinzas por diferença do conteúdo de matéria orgânica; proteína bruta (PB), obtida pela determinação do N total, utilizando a técnica de micro-Kjedhal e um fator de conversão igual a 6,25, segundo técnicas descritas por Silva & Queiróz (2002). A fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas segundo metodologia descrita por Van Soest (1985).

2.9. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, a 5% de significância, utilizando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2000). Para o fator qualitativo (inoculante

microbiano), utilizou-se o teste “F” e para o fator quantitativo (níveis de estilosantes) foi realizada análise de regressão.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição bromatológica das plantas antes da ensilagem

Os resultados referentes à composição bromatológica das forragens antes da ensilagem encontram-se na Tabela 1. Verifica-se aumento nos teores de MS e PB com o incremento na proporção de estilosantes. Em relação aos teores de FDN e FDA, observou-se tendência de diminuição destes com o aumento do nível de estilosantes.

Tabela1 – Teores de matéria seca (MS), cinzas, proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido nas diferentes proporções de estilosantes com capim-marandu

	MS(%)	Cinza	PB	FDN	FDA
Níveis de estilosantes (%)	(%MS)				
0	22,83	8,72	6,93	74,42	42,81
10	22,37	7,02	7,92	71,12	40,43
20	23,14	7,24	8,20	72,07	41,60
30	24,08	7,42	10,76	63,70	39,15

O aumento do teor de matéria seca e proteína bruta com o incremento na proporção de estilosantes se devem aos maiores teores desses constituintes na leguminosa. Leonel et al. (2008) avaliaram a produção de silagem consorciada de capim-braquiária e soja em diferentes estádios de colheita da leguminosa e observaram aumento nos teores de MS e PB no consórcio. O teor de MS de 25%, preconizado por McDonald et al. (1991), como condição necessária para que as perdas por efluente no silo sejam minimizadas não foram obtidas em nenhuma das proporções avaliadas. Entretanto, observa-se que com 20 e 30% de estilosantes, os teores de MS foram muito próximos ao recomendado.

O teor de MS desempenha papel fundamental na produção de silagem, quer seja aumentando a proporção de nutrientes e facilitando os processos fermentativos, quer seja diminuindo a ação de microrganismos indesejáveis no processo fermentativo. O excesso de umidade implica em riscos de fermentações indesejáveis, já que a menor pressão osmótica favorece o desenvolvimento de bactérias do gênero *Clostridium*. O crescimento clostridiano é estimulado por baixos teores de carboidratos solúveis e de MS, típicos em silagens de gramíneas.

O menor teor de FDN e FDA observado com o aumento na proporção de estilosantes se devem ao menor teor desses constituintes na leguminosa em relação à gramínea.

3.2. Composição bromatológica das silagens

Na Tabela 2, são apresentados os dados da composição bromatológica das silagens de capim-marandu com diferentes proporções de estilosantes em função do uso de inoculante, as equações de regressão e seus respectivos coeficientes de variação. Observou-se efeito da interação inoculante x nível de estilosantes sobre o teor de MS. Avaliando-se o efeito de inoculante dentro de níveis de estilosantes, verificaram-se valores superiores ($P < 0,05$) de MS nas silagens inoculadas, contendo 10 e 20% de estilosantes. A variação nos teores de MS com a utilização de inoculante microbiano se deve, possivelmente, às diferenças nas populações microbianas predominantes, uma vez que as fermentações realizadas por fungos e leveduras tendem a produzir mais água em relação as fermentações por BAL. Os principais produtos finais da fermentação realizada por bactérias do gênero *Clostridium* são o ácido butírico, água e o dióxido de carbono (CO_2) que, em conjunto, podem assinalar elevadas perdas (McDonald et al., 1991). O aumento linear nos teores de MS com o incremento da proporção de estilosantes se deve aos menores teores de matéria seca da braquiária em relação ao estilosantes. Comportamento semelhante foi observado por Ribeiro et al. (2011a) ao avaliarem a composição bromatológica de silagens mistas de estilosantes Campo Grande e capim-elefante.

Os teores de PB foram afetados apenas pelos níveis de estilosantes, que aumentaram linearmente ($P < 0,05$) com o incremento da proporção de estilosantes nas silagens. Isso se deve a maior concentração de N na leguminosa em relação à braquiária. Porém, o aumento nos teores de PB pode prejudicar o perfil fermentativo das silagens, já que leguminosas apresentam maiores taxas de proteólises quando comparadas às gramíneas (Pereira et al., 2009), elevando o poder tampão, principalmente pela produção de amônia, dificultando a queda do pH e favorecendo o crescimento de microrganismos indesejáveis.

A exemplo da PB, os constituintes da fração fibrosa das silagens foram afetados apenas pelos níveis de estilosantes. Os teores de FDN e FDA foram influenciados de forma linear e quadrática, respectivamente, pelos níveis de estilosantes. Observou-se teor de FDA máximo de 41,38% no nível de 10,24 % de estilosantes. Os menores teores de fibra em leguminosas em relação às gramíneas tropicais são explicados, principalmente, pelas diferenças fisiológicas entre elas, sendo a braquiária uma espécie C_4 e a leguminosa C_3 . Diferenças nos teores de fibras entre silagens de gramíneas e leguminosas também foram observadas por Leonel et al. (2008) e Ribeiro et al. (2011a), sendo este indicativo de maior digestibilidade e, conseqüentemente, melhor valor nutritivo das silagens.

Tabela 2 – Teores de matéria seca (MS), cinzas, proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) das silagens de capim-marandu com diferentes proporções de *Stylosanthes*

Níveis de estilosantes (%)		CV (%)		Equações de regressão		R ²
Inoculante	0	10	20	30		
MS (%)					1,06	
Sem	21,58a	21,51b	21,95b	23,46a	$\hat{Y} = 21,2115 + 0,0609X$	0,74
Com	21,51a	21,89a	22,41a	22,96b	$\hat{Y} = 21,4615 + 0,048525X$	0,99
Cinzas (% MS)					5,06	
Sem	6,44	7,33	7,12	7,72	$\hat{Y} = 6,841625 + 0,02785X$	0,71
Com	6,82	7,52	7,74	7,39		
PB (%MS)					7,56	
Sem	7,88	7,20	8,31	9,32	$\hat{Y} = 7,376 + 0,0551X$	0,87
Com	7,37	8,01	8,44	9,09		
FDN (%MS)					2,34	
Sem	70,71	70,26	66,00	62,40	$\hat{Y} = 71,62025 - 0,265163X$	0,93
Com	70,87	69,51	67,92	63,46		
FDA (%MS)					3,11	
Sem	40,62	42,36	40,34	39,48	$\hat{Y} = 40,859563 + 0,101019X - 0,004934X^2$	0,92
Com	40,92	40,94	40,91	39,60		

3.3. Populações microbianas e perfil fermentativo das silagens

Na Tabela 3, encontram-se os valores de pH, N-amoniaco (N-NH_3) e a quantificação das populações microbianas nas silagens com diferentes proporções de estilosantes com e sem inoculante microbiano.

Observou-se efeito ($P < 0,05$) apenas de nível de estilosantes sobre o pH das silagens, cujos dados ajustaram-se a um modelo quadrático, estimando-se valor máximo de 4,16 para o nível de 12,25% da leguminosa na massa ensilada. Destaca-se que, independente do nível de estilosantes, os valores de pH registrados são indicadores de boa fermentação para silagens de gramíneas e leguminosas, segundo critérios estabelecidos por Mahanna (1993), uma vez que leguminosas apresentam maior poder tampão em relação às gramíneas, tendendo a manter o pH em valores mais elevados. Valor de pH abaixo de 4,5 é o ideal para silagens de leguminosas (Ward e Ondarza, 2008). Para Kung Jr e Shaver (2001), o pH de silagens de leguminosas com 30% de MS e silagens de gramíneas perenes de clima temperado varia de 4,3 a 4,7. Outros estudos (Leibensperger e Pitt., 1987; Leonel et al., 2008; Ribeiro, 2011b) mostraram comportamento semelhante ao verificado no presente trabalho para essa característica.

A exemplo do observado para o pH, o teor de N-NH_3 foi afetado apenas pelos níveis de estilosantes, estimando-se decréscimos de 0,11 unidades por unidade de estilosantes adicionada a massa ensilada. A redução da concentração de nitrogênio amoniacal com adição de estilosantes no consórcio pode ser atribuída à queda no pH, favorecido pelo maior desenvolvimento de BAL. Segundo McDonald et al. (1991), os valores de pH estão relacionados diretamente com a concentração de N-NH_3 porque microrganismos proteolíticos como enterobactérias e bactérias clostrídicas se desenvolvem melhor em pH elevados.

Observou-se efeito ($P < 0,05$) de inoculante e nível de estilosantes sobre a população de BAL. A população de BAL foi superior ($P < 0,05$) na silagem inoculada apenas na silagem controle, não sendo observada diferença entre silagens inoculadas ou não, na presença de estilosantes. Observou-se aumento linear na população de

BAL com incremento da proporção de estilosantes. Isso se deve, possivelmente, ao maior teor de PB do estilosantes, aumentando assim a disponibilidade de aminoácidos essenciais para o crescimento das bactérias do ácido lático, conforme verificado por Brady (1966).

Tabela 3 – Valores médios de pH, nitrogênio amoniacal, população microbiana de bactérias do ácido lático (BAL), fungos e leveduras (F/L) e enterobactérias (ENT) em silagens de capim-maranducom diferentes proporções de estilosantes

Inoculante	Níveis de estilosantes (%)				Médias	CV (%)	Equações de regressão	R ²
	0	10	20	30				
	pH					2,78		
sem	4,07	4,05	4,11	3,90			$\hat{Y} = 4,058375 + 0,017150X - 0,0007X^2$	0,98
com	4,05	4,24	4,16	3,98				
	N-NH ₃					14,20		
sem	12,26	15,21	12,89	10,14			$\hat{Y} = 14,594875 - 0,116638X$	0,82
com	15,60	13,24	12,44	10,99				
	BAL					2,05		
sem	7,42b	7,58a	7,82a	7,96a	7,69b		$\hat{Y} = 7,543 + 0,01455X$	0,94
com	7,75a	7,66a	7,90a	8,01a	7,83a			
	Fungo / Levedura					25,84		
sem	3,57a	2,66a	3,21a	3,30a			$\hat{Y} = 3,4755 - 0,0782X + 0,002525X^2$	0,58
com	2,04b	2,30a	3,27a	4,39a			$\hat{Y} = 1,7905 + 0,08055X$	0,94
	Enterobactérias							
sem	0,56	ND	ND	ND				
com	ND	ND	ND	ND				

Observou-se efeito da interação ($P < 0,05$) inoculante x níveis de estilosantes sobre a população de fungos e leveduras. A população de fungos e leveduras foi superior ($P < 0,05$) na silagem sem inoculante apenas no tratamento controle, não sendo observada diferença entre silagens inoculadas ou não, na presença de estilosantes. Observou-se aumento linear na população de fungos e leveduras com incremento dos níveis de estilosantes nas silagens inoculadas. Para as silagens sem inoculante, observou-se efeito quadrático, estimando-se a população mínima de fungos e leveduras de $2,87 \log \text{ UFC g}^{-1}$ com 15,48% de estilosantes na massa ensilada.

A população de enterobactérias foi observada somente no tratamento controle sem inoculante.

3.4. Perdas e recuperação de matéria seca das silagens

Na Tabela 4, encontram-se os valores médios das perdas por gases e efluentes e da recuperação de matéria seca das silagens, em função de inoculante e de níveis de estilosantes.

A produção de gases não foi afetada pelos fatores inoculante, nível de estilosantes, nem pela interação destes, registrando-se valor médio de 2,91 (%MS). Esse comportamento se deve, possivelmente, aos valores próximos de MS e populações microbianas das silagens. A produção de gás na silagem é resultante de fermentações secundárias, realizadas por enterobactérias, bactérias clostrídicas e microrganismos aeróbios, que se desenvolvem melhor em meios com baixo teor de matéria seca (Muck, 1996). Zopollatto et al. (2009), em artigo de revisão sobre o uso de aditivos microbianos e dos aspectos da ensilagem no Brasil, encontraram valores de perdas por gases em gramíneas variando de 2,4 à 8,5% MS, com média de 4,7% MS.

Observou-se efeito da interação ($P < 0,05$) inoculante x níveis de estilosantes sobre as perdas por efluente e recuperação de matéria seca. Avaliando-se o efeito de nível de estilosantes dentro de inoculante, observou-se maior perda por efluente na

silagem sem inoculante no nível de 10% de estilosantes. A produção de efluente é uma das formas de perda no valor nutritivo das silagens, sendo influenciada pelos teores de matéria seca da planta, tipo e dimensão do silo e grau de compactação (Pereira et al., 2004). A produção de efluente decresceu linearmente ($P < 0,05$) na silagem sem aditivo com o incremento dos níveis de estilosantes.

Tabela 4 – Valores médios da recuperação de matéria seca (RMS), perdas por efluente (PE) e perdas por gases (PG) das silagens de capim-marandu com diferentes níveis de estilosantes

Inoculante	Níveis de estilosantes (%)				CV (%)	Equações de regressão	R ²
	0	10	20	30			
	Perdas por gases (%MS)				45,57		
Sem	3,96	2,74	2,26	2,57			
Com	3,60	3,12	2,45	2,58			
	Perdas por efluente (kg/ ton MN)				23,29		
Sem	25,84a	20,94a	12,44a	10,85a		$\hat{Y} = 25,53725 - 0,534525X$	0,94
Com	29,64a	13,05b	14,38a	14,08a		$\hat{Y} = 28,66225 - 1,675775X + 0,040738X^2$	0,90
	Recuperação de MS (%)				1,20		
Sem	93,58a	96,35a	95,51a	97,43a		$\hat{Y} = 94,10675 + 0,107175X$	0,72
Com	92,81a	97,49a	97,01a	95,15b		$\hat{Y} = 92,998625 + 0,555738X - 0,016344X^2$	0,95

Na presença de inoculante, estimou-se valor mínimo de perda por efluente igual a $11,43 \text{ kg t}^{-1} \text{ MN}$ para o nível de 20,5% de estilosantes. Esse efeito apresenta relação direta com os teores de matéria seca, havendo diminuição das perdas com aumento nos teores de MS. Os valores encontrados situam-se dentro da faixa de 11,5 a $68,5 \text{ kg t}^{-1} \text{ MN}$, registrados por Zapollatto et al. (2009), para silagens de gramíneas tropicais.

Observou-se efeito da interação ($P < 0,05$) inoculante x níveis de estilosantes sobre a recuperação de matéria seca (RMS). Verificou-se maior RMS ($P < 0,05$) na silagem não inoculada com 30% de estilosantes. A recuperação de matéria seca aumentou linearmente com os níveis de estilosantes na ausência de inoculante. No entanto, na presença de inoculante, estimou-se máxima recuperação de matéria seca de 97,72% para o nível de 17% de estilosantes na massa ensilada. Isso se deve, possivelmente, ao aumento nos teores de MS, proporcionando melhor perfil fermentativo e diminuição das perdas por gases e efluentes. Os valores encontrados neste trabalho para as silagens contendo estilosantes são superiores ao valor médio de 92% registrados por Zapollatto et al. (2009) para silagens de gramíneas. Isso indica que a ensilagem de leguminosas em associação com gramíneas é uma alternativa para redução de perdas e melhor recuperação da matéria seca ensilada.

4. Conclusão

O estilante melhora a qualidade nutricional, o perfil fermentativo e diminui as perdas de silagens com capim-marandu.

O uso de 20 a 30% de estilantes na matéria natural para produção de silagens mistas de capim-marandu e estilantes proporciona maior recuperação de matéria seca da massa ensilada.

O uso de inoculante microbiano não apresenta benefícios em relação à composição bromatológica, ao perfil fermentativo e nas perdas de matéria seca em silagens mistas de capim-marandu e estilantes.

Referências Bibliográficas

AGRIPOINT. 2007. Pesquisa Top BeefPoint de confinamentos: Os 50 maiores confinamentos do Brasil em 2006. http://wm.agripoint.com.br/imagens/banco/beefpoint/Top50_2006_07.pdf

ANDRADE, C. M. S. Produção de ruminantes em pastos consorciados. In: **Simpósio Sobre Manejo Estratégico da Pastagem**, 5., 2010, Viçosa. SIMFOR. 2010. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa.

BARROS, A.M., FALEIRO, F.G., KARIA, C.T., SHIRATSUCHI, L.S., ANDRADE, R.P., LOPES, G.K.B. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesq. Agropec. Bras.** v. 40, p. 899-909, 2005.

BOLSEN, K.K.; LIN, C.; BRENT, B.E. et al. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.11, p.3066-3083, 1992.

BRADY, C.J. The redistribution of nitrogen in silage by lactic-acid-producing bacteria. *Australian Journal of Biological Science* v.19, p. 123-130, 1966.

CARNEIRO, A.M., RODRIGUES, N. M. **Influência da leguminosa na qualidade da silagem de milho**. Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, v. 32, n.3, p.415-20, 1980.

COSTA, N. M. S. **Revisão do Gênero de *Stylosanthes* Sw.** Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 470 p, 2006.

EDYE, L.A.; GROF, B.; WALKER, B. Agronomic variation and potential utilization of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M., EDYE, L.A. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney: Academic Press, 1984. p.547-570.

FARIA, V.D.; CORSI, M. Atualização em produção de forragem. Piracicaba. **Anais...** ed. Rev. Piracicaba: Fealq, 1986. 76p.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1. Pacote computacional).

FERREIRA, M.B.; COSTA, N.M.S. **O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1979. 107p.

GONÇALVES, C.A.; COSTA, N. L. Avaliação agronômica de Brachiaria humidicola em consorciação com leguminosas forrageiras tropicais em Rondônia. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V. 23, n. 5, p.699-708, 1994.

KARIA, C.T.; ANDRADE, R.P.; CHARCHAR, M.J.d'A.; GOMES, A.C. **Caracterização morfológica de acessos do gênero Stylosanthes no banco ativo de germoplasma da Embrapa Cerrados - coleção 1994/1995**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 24p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 72).

KUNG Jr. L; SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. University of Wisconsin Board of Regents, **Focus on Forage**, v.3, n.13, 2001.

LEIBENSPERGER, R.Y., PITT, R.E. A model of clostridial dominance in ensilage. **Grass and Forage Science**, v.42, p.297 -317, 1987.

LEONEL, F.P.; PEREIRA, J.C.; COSTA, M.G.; DE MARCO, P.; LARA, L.A.; SOUSA, D.P.; SILVA, C.J. Consórcio capim braquiária e soja, produtividade das culturas e características qualitativas das silagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.11, p.2031-2040, 2008.

McALLISTER, T.A., FENIUK, R., MIR, Z., MIR, P., SELINGER, L.B. and CHENG, K.J. Inoculants for alfalfa silage: Effects on aerobic stability, digestibility and growth performance of feedlot steers. **Livestock Production Science**. v.53, p.171-181, 1998.

MACEDO, M.C.M. et al. **Degradação e alternativas de recuperação e renovação de pastagens**. Dourados : Embrapa-CPAO, 2000. 4p. (Embrapa-CPAO. Comunicado Técnico, 62).

MACEDO, M.C.M. Pastagens no ecossistema cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. A produção animal e o foco no agronegócio: **Anais...** Goiânia: SBZ, 2005. p.56- 58.

MAHANNA, W.C. Troubleshooting silage problems. Four State Applied Nutrition Conference, June 20-30. La Crosse, WI. 1993.

McDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. **The biochemistry of silage**. Marlow Bucks: Chalcombe Publications, 1991. 340p.

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

OLIVEIRA, J.P.; BURITY, H.A.; LYRA, M.C.C. et al. Avaliação da fixação e transferência de nitrogênio na associação gramíneas-leguminosas forrageiras tropicais, através da diluição isotópica do ¹⁵N. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.25, p.210, 1996.

PEREIRA, O.G.; OLIVEIRA, A.S.; RIBEIRO, K.G. Strategies to enable the use of legume silage in ruminant production. In: International Symposium on Forage Quality and Conservation. São Pedro, **Anais...** Piracicaba, FEALQ, 2009.

PEREIRA, O.G.; BERNARDINO, F.S. Controle de efluentes na produção de silagem. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 2.; 2004, Viçosa. **Anais...** 2004.

RIBEIRO, K. G.; PEREIRA, O.G., RIGUEIRA, J. P.S.; SOUZA, W. F.; ROSA, L. O.; SILVA, V.P. Perfil fermentativo de silagens mistas de estilosantes Campo Grande e capim-elefante. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48., Belém, 2011. **CD-ROM**.

RIBEIRO, K.G.; PEREIRA, O.G.; CEZÁRIO, A.S.; CAMPOS, A.F.; RUFINO, L.D.A.; CARDOSO, L.L. Composição bromatológica de silagens mistas de estilosantes Campo Grande e capim-elefante. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Belém, 48., 2011. **CD-ROM**.

SCHMIDT, P. **Perdas fermentativas na ensilagem, parâmetros digestivos e desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo silagens de cana-de açúcar**. Piracicaba. Universidade de São Paulo, 2006. 228p. Tese (Doutorado em Agronomia). USP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2006.

SILVA, D.J.; QUEIRÓZ, A.C. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.

SOUZA, F.B.; ANDRADE, R.P.; THOMAS, D. *Stylosanthes guyanensis* cv. Bandeirantes, numa leguminosa forrageira para os cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.18, n.3, p.319-320, 1983b.

SOUZA, F.B.; ANDRADE, R.P.; THOMAS, D. *Stylosanthes macrocephala* cv. Pioneira, uma leguminosa forrageira para os cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.18, n.3, p.321-322, 1983a.

SPAIN, J.M.; VILELA, L. Perspectivas para pastagens consorciadas na América Latina nos anos 90 e futuros. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 28, 1990, Campinas. **Anais...** Campinas: SBZ, 1990, p.101-119.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, N. J. B. **Analysis of forages and fibrous food**. 1 ed. Ithaca: Cornell University, 1985, 202p.

VILELA, L.; SOUZA, D. M. G.; SILVA, J. E. Adubação potássica. In: SOUZA, D. M. G. de; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrados: correção do solo e adubação**. 2. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. p. 169-178.

WARD, R.T.; ONDARZA, M.B. Fermentation analysis of silage: Use and interpretation. Cumberland Valley Analytical Service, Inc., Hangestown, MD. 2008.

WILLIAMS, R.J.; RAID, R.; SCHULTZE-KRAFT, R.; SOUZA COSTA, N. M.; THOMAS, B. D. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney: Academic Press, 1984. p.73-101.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSO, L. G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.170-189, 2009.

ARTIGO 3 - POPULAÇÕES MICROBIANAS, PERFIL FERMENTATIVO E COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DE SILAGENS DE CAPIM-MARANDU TRATADAS COM INOCULANTES MICROBIANO COMERCIAL E ISOLADO DE GRAMÍNEAS TROPICAIS

Resumo

Avaliou-se a população microbiana, o perfil fermentativo e a composição bromatológica de silagens de capim-marandu tratadas com inoculantes microbiano comercial e isolado de gramínea tropical. Utilizou-se um esquema fatorial 6 x 3, com seis períodos de fermentação e três inoculantes, incluindo o controle, em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os períodos de fermentação foram 1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias. Os inoculantes foram o Sil All C4 (Alltech do Brasil) e uma cepa de *Lactobacillus plantarum* isolada do capim-mombaça (M17). O capim-marandu foi colhido aos 70 dias de rebrotação e ensilado em sacos plásticos medindo 25 cm x 35 cm e selados a vácuo com auxílio de uma máquina seladora. A composição bromatológica das silagens foi analisada apenas no último período de fermentação. Observou-se menor ($P<0,05$) teor de matéria seca na silagem controle, em relação à inoculada com Sil All. Observou-se menor ($P<0,05$) teor de fibra em detergente neutro na silagem inoculada com a cepa M17. Os teores de proteína bruta e fibra em detergente ácido não foram influenciados pelos inoculantes, registrando-se valores médios de 6,28% e 75,55%, respectivamente. Observou-se efeito da interação inoculante x períodos de fermentação sobre a população de bactérias do ácido láctico (BAL) e pH das silagens, cujos dados ajustaram-se a modelos quadráticos. No último período de fermentação, registrou-se menor ($P<0,05$) pH nas silagens controle e inoculada com M17. Para amônia, observou-se efeito de inoculante e de período de fermentação. Observou-se efeito da interação inoculante x período de fermentação sobre a população de BAL. A população de fungos e leveduras foi influenciada de forma quadrática pelo período de fermentação, sendo registrada menor ($P<0,05$) população desses microrganismos na silagem inoculada com M17. As silagens avaliadas podem ser consideradas de boa qualidade com base nos valores de pH e N-NH₃, independentemente do uso de inoculante microbiano.

Palavras chave: Amônia, bactéria do ácido láctico, enterobactérias, proteína bruta

Abstract

In this experiment evaluated the microbial population, the fermentation and chemical composition of marandu grass silages treated with commercial microbial inoculantes or isolated from tropical grass. Was used a 6 x 3 factorial arrangement with six fermentation periods and three inoculants, including the control, in a completely randomized design with three replications. The fermentation periods were 1, 3, 7, 14, 28 and 56 days. The inoculants were used were Sil All C4 (Alltech of Brazil) and a strain of *Lactobacillus plantarum* isolated from tropical grass (M17). The marandu grass was harvested at 70 days of regrowth and ensiled in plastic bags measuring 25 cm x 35 cm vacuum sealed with the aid of a vacuum sealing machine. The compositions of the silages were analyzed only in the latter period of fermentation. There was less ($P<0.05$) dry matter content in the control silage, compared to inoculated with Sil All. There was less ($P<0.05$) content of neutral detergent fiber in silage inoculated with the strain M17. The crude protein and acid detergent fiber were not influenced by inoculants, registering average of 6.28% and 75.55% respectively. Was observed interaction effect of inoculants x fermentation period on the population of lactic acid bacteria (LAB) and pH of the silage, whose data adjusted to quadratic models. In the last period of fermentation, there was lower ($P<0.05$) silage pH in control treatment and inoculated with M17. For ammonia, observed an effect of inoculant and fermentation period. Was observed interaction effect between inoculants x fermentation period on the lactic acid bacteria population. The population of fungi and yeast was influenced quadratically by fermentation period, being recorded lower ($P<0.05$) population of these microorganisms in silage inoculated with M17. The silages assessed can be considered of good quality based on pH and $\text{NH}_3\text{-N}$ values, regardless of the use of microbial inoculants.

Keywords: Ammonia, lactic acid bacteria, enterobacteria, crude protein

1. Introdução

A estacionalidade de produção de forragens é reconhecida como um dos principais fatores responsáveis pelos baixos índices de produtividade da pecuária nacional, havendo a necessidade de planejamento para suplementação no período da seca, quando ocorre redução na qualidade e na produção de matéria seca das forrageiras. Em muitas partes do mundo, a conservação de forragem é fator-chave para incrementar a produtividade de ruminantes, pois permite adequada suplementação de alimento quando a taxa de crescimento das forrageiras é baixa. Desta forma, a conservação pode prover oferta uniforme de forragens de boa qualidade ao longo do ano (Muck e Shinnners, 2001).

Dentre as várias opções de suplementação volumosa, a silagem de capim tem-se apresentado como boa alternativa, sendo utilizada em 18% dos 50 maiores confinamentos do Brasil, no ano de 2006 (Agripoint, 2007). O interesse na utilização de silagem de capim se deve às vantagens como elevada produção anual por área, perenidade das pastagens, baixo risco de perdas e maior flexibilidade de colheita (Corrêa et al., 2001). Porém, a ensilagem de gramíneas tropicais também apresenta algumas limitações, como baixo teor de carboidratos solúveis, necessários para uma fermentação adequada, baixo teor de matéria seca no momento do corte, alto poder tampão, baixa população autóctone de bactérias produtoras de ácido lático e menor teor energético em comparação com o milho e sorgo (Pereira et al., 2008).

Atualmente, uma grande variedade de aditivos está sendo recomendada para melhorar o perfil fermentativo das silagens, diminuindo assim as perdas de matéria seca. Dentre os aditivos utilizados, os inoculantes microbianos tem se destacado em relação aos químicos por serem seguros, fáceis de usar, não corrosivos ao maquinário, por não poluírem o meio ambiente e por serem considerados produtos naturais (Weinberg e Muck, 1996). O uso de inoculantes microbianos abrange a classe de aditivos com mais rápido crescimento em todo mundo. A composição destes difere muito em sua capacidade de fermentar os vários substratos e na sua capacidade de crescer em meios com diferentes umidades e temperaturas (Muck e Kung, 1997).

Diversos estudos têm avaliado o efeito dos inoculantes sobre a fermentação de várias forrageiras e, na maioria deles, notou-se queda do pH e aumento nos níveis

de ácido láctico (Bolsen et al. 1995). A eficiência do uso de inoculantes em silagens depende da população de bactérias existente na cultura, do poder tampão e da quantidade e qualidade dos microrganismos adicionados à cultura (Vilela, 1997), sendo a população mínima recomendada igual a 100.000 UFC por grama de forragem, segundo Muck (1996).

Os inoculantes comerciais apresentam grande variação quanto às espécies e estirpes de BAL, sendo predominantes BAL homofermentativas como o *L. plantarum*. A preferência por homofermentativas é devida à produção quase exclusiva de ácido láctico (>85%), sendo este o principal responsável pela redução do pH nas silagens. As bactérias heterofermentativas, além da produção de ácido láctico, produzem ácido acético, etanol e CO₂, sendo o *L. buchneri* a espécie com maior interesse comercial. Muck (2008) avaliou os possíveis fatores para a falta de efeito de inoculantes em silagens e destacou que algumas estirpes apresentam preferência para crescerem em certos tipos de forragem. Isso pode ser comprovado no trabalho de Hill et al. (1989), que isolaram três cepas de *L. plantarum*, uma da alfafa e outras do milho e sorgo. As mesmas foram co-inoculadas nessas três forrageiras, e a cepa dominante em cada silagem foi aquela isolada da própria planta. Isso sugere que um inoculante desenvolvido para alfafa pode não ser eficiente para milho ou sorgo, dificultando sobremaneira uma resposta padrão do uso de inoculantes. Tem-se obtido maior sucesso com inoculantes aplicados na ensilagem de capins e leguminosas do que na ensilagem de milho (Muck, 1993) e do sorgo (Rodriguez et al., 2001), possivelmente pela maior população de microrganismos presentes nestas últimas.

Considerando que as principais empresas produtoras de inoculantes microbianos são estrangeiras, e que as cepas presentes nesses produtos foram isoladas de espécies forrageiras e condições climáticas diferentes das encontradas no Brasil, buscou-se com este experimento avaliar as populações microbianas, o perfil fermentativo e a composição bromatológica de silagens de capim-marandu inoculadas com estirpes isoladas de gramínea tropical e inoculante comercial.

2. Material e Métodos

2.1. Local e condições climáticas

O experimento foi realizado em área do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizada no município de Viçosa-MG. A cidade de Viçosa está situada a 20° e 45' de latitude sul, 42° e 51' de longitude oeste e 657 m de altitude, apresentando precipitação média anual de 1341 mm, dos quais cerca de 86% ocorrem nos meses de outubro a março. O solo local é classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo, com textura franco-argilosa.

2.2. Delineamento experimental

Utilizou-se um esquema fatorial 3 x 6 (três inoculantes x seis períodos de fermentação), em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Os inoculantes utilizados foram controle (sem inoculante), Sil All C4 (Alltech do Brasil) e *L. plantarum* isolado do capim-mombaça. Os períodos de fermentação avaliados foram: 1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias após o fechamento dos silos.

2.3. Manejo e ensilagem do Capim-marandu

Em outubro de 2010, foi feito um corte de uniformização do pasto de marandu estabelecido em 2005, utilizando-se uma roçadeira costal. Logo após o corte, aplicou-se em cobertura 250 kg ha⁻¹ do adubo 20-0-20.

O capim foi cortado a 10 cm do solo, aos 70 dias de rebrotação. Logo após, procedeu-se a picagem com auxílio de uma máquina ensiladora estacionária. Em seguida, procedeu-se a ensilagem em sacos plásticos de 25 cm x 35 cm (Doug Care equipment, Inc., Spring Ville, CA), colocando-se 400 gramas de forragem por saco (Figura 1). Os sacos foram selados depois da retirada do oxigênio usando uma máquina seladora a vácuo.



Figura 1- Detalhe do silo experimental com o material ensilado.

2.5. Aplicação de inoculantes

O inoculante M17 foi previamente preparado no Laboratório de Forragicultura do Departamento de Zootecnia da UFV, sendo constituído pela bactéria *Lactobacillus plantarum* (M17), isolada da planta de *Panicum maximum* cv. Mombaça, citada no experimento 1 desta tese. Inicialmente, o microrganismo isolado foi cultivado em tubos contendo 2 mL de caldo MRS (De Man Rogosa Sharpe, Difco) por 24 h; depois foi transferido para tubos contendo 10 mL de caldo MRS, por mais 24 h e, finalmente, transferido para *erlenmeyer* estéril com 250 mL de caldo MRS e cultivado por 24 h. Após esse período, realizou-se a contagem do número de células através do plaqueamento da mistura em diluições decimais, obtendo-se uma concentração de 10^8 UFC mL⁻¹. Após o conhecimento da concentração de BAL, foram feitas três centrifugações da solução com água destilada para retirada do meio de cultura, pois como este é rico em açúcares, sua adição na silagem poderia alterar o teor de CHO's solúveis e, assim, gerar efeito de confundimento. Foi utilizado 1 mL da solução 10^8 UFC mL⁻¹, sendo esta diluída em 9 mL de água destilada, obtendo uma concentração de 10^7 UFC mL⁻¹. Os 10 mL da solução foram aplicados em 3 kg de capim picado com auxílio de um pulverizador manual com capacidade de 250 mL, obtendo-se uma concentração final de 10^5 UFC de *L. plantarum* g⁻¹ de forragem fresca. O inoculante microbiano comercial Sil All C4 (Alltech do Brasil) foi aplicado segundo as recomendação do fabricante na seguinte proporção: 250 g diluídos em 50 L de água para 50 t de forragem. Após a diluição, ele foi aplicado em 3 kg de forragem, com auxílio de um pulverizador manual, com capacidade de 250 mL. O inoculante Sil All C4 contém os seguintes níveis de garantia: *Lactobacillus plantarum* (10 bilhões UFC g⁻¹), *Pediococcus acidilactici* (1 bilhão UFC g⁻¹), *Enterococcus faecium* (10 bilhões de UFC g⁻¹), uma composição básica de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e dextrose.

2.6. Análises laboratoriais

A pré-secagem da forragem e das silagens foi realizada por meio de secagem em estufa de ventilação forçada a 60° C, por 72 h. Essas amostras foram moídas em

moinho tipo “Willey”, com peneira de 1 mm e armazenadas em potes plásticos de polietileno para posteriores análises laboratoriais. Nas amostras moídas, foram efetuadas determinações de FDN e FDA, segundo Van Soest e Robertson (1985). A matéria seca e o nitrogênio total foram determinados segundo técnicas descritas por Silva & Queiróz (2002), sendo o teor de N multiplicado pelo fator 6,25, considerando que a proteína possui 16% de N.

2.6.1. Análises de pH e N-NH₃

Na abertura dos silos, foram pesadas 25 g de silagem, as quais foram homogeneizadas por 1 minuto em 225 mL de água destilada, utilizando liquidificador. Em seguida, foi realizada a leitura do pH, utilizando-se potenciômetro. Em 200 mL de solução de H₂SO₄, 2 N, foram colocados 25 g de silagem, permanecendo em repouso na geladeira por 48 h; após filtragem em papel de filtro, foi feita a determinação do nitrogênio amoniacal, segundo procedimentos descritos por Bolsen et al. (1992).

2.6.2. Quantificação das populações microbianas

As populações microbianas foram quantificadas utilizando-se meios de culturas seletivos para cada grupo microbiano: Agar Rogosa (Difco), para enumeração das bactérias do ácido láctico; Violet Red Bile (Difco) em sobrecamada, para enumeração de enterobactérias e Potato Dextrose Agar (BDA), para enumeração de fungos e leveduras.

2.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa SISVAR. Para os fatores qualitativos realizou-se o teste de Tukey e para os fatores quantitativos análises de regressão. Para testar o efeito do inoculante nos diferentes períodos de abertura, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de significância. O desdobramento dos fatores foi realizado quando a interação entre eles foi significativa ao nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição bromatológica das plantas antes da ensilagem

Na Tabela 1, observa-se a composição bromatológica das plantas antes da ensilagem. Os teores de MS, PB, FDN e FDA foram semelhantes aos encontrados na literatura para gramínea do gênero *Brachiaria* com 70 dias de rebrotação. Destaca-se, que os teores de MS da planta no momento da ensilagem proporcionam condições adequadas para fermentação de boa qualidade, segundo McDonald et al (1991). Esses autores preconizaram que a planta no momento da ensilagem deve apresentar teor mínimo de 25% de MS para que as perdas por efluente no silo sejam minimizadas e, portanto, ocorra a manutenção dos nutrientes nas suas silagens.

Tabela 1- Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) de plantas de capim-marandu antes da ensilagem

Item	Forragem		
	Controle	Sil All	M17
MS (%)	26,90	26,66	26,70
PB (%MS)	6,77	6,57	6,61
FDN (%MS)	76,64	75,43	76,66
FDA (%MS)	43,28	42,14	43,00

Na Tabela 2, encontram-se os valores médios dos teores de MS, PB, FDN e FDA das silagens analisadas após 56 dias de ensilagem em função de inoculantes microbianos. Foi observado menor ($P<0,05$) teor de MS na silagem controle em relação àquela com inoculante microbiano Sil All C4. A diminuição no teor de MS se deve, possivelmente, pela formação da denominada “água de metabolismo”, produzida durante a fermentação por microrganismos deterioradores por meio da oxidação de nutrientes solúveis (Woolford, 1984).

Não foi observado efeito ($P>0,05$) de inoculante sobre os teores de PB das silagens. Porém, observa-se que nas silagens inoculadas os teores de PB ficaram próximos aos das respectivas plantas *in natura*. Isso sugere adequada fermentação,

com pouca perda de N através da proteólise. Ávila et al. (2009) avaliaram a composição bromatológica de silagens de capim-mombaça inoculadas com inoculante comercial e cepas de *L. buchneri* isoladas de cana-de-açúcar e também não observaram diferenças nos teores de PB das silagens.

Com relação aos teores de FDN, estes foram menores ($P < 0,05$) nas silagens inoculadas com a cepa M17 isolada de capim-mombaça. A redução no teor de FDN em silagens se deve, provavelmente, à hidrólise ácida de enzimas da planta ou dos microrganismos presentes no processo de ensilagem (McDonald et al. 1991). Outra possível explicação seria a maior população de *L. plantarum* inoculadas no momento da ensilagem nesse tratamento. Redução nos teores de FDN, durante o período de fermentação, também foram observados por Pereira et al. (2007) e Santos et al. (2007). Por outro lado, os teores de FDA não diferiram entre os inoculantes usados. Isso se deve ao fato dos microrganismos não digerirem a lignina e a celulose, componentes da FDA.

Tabela 2 - Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) das silagens de capim-marandu após 56 dias de fermentação

Item	Inoculantes			CV (%)
	Controle	Sil All	M17	
MS (%)	24,00b	25,33a	24,66ab	1,91
PB (%MS)	6,02a	6,34a	6,47a	4,80
FDN (%MS)	75,77a	76,33a	74,57b	0,61
FDA (%MS)	44,45a	45,27a	43,81a	1,66

Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

Na Tabela 3, encontram-se as variações de pH e N-NH₃ durante o período de fermentação das silagens inoculadas ou não e as respectivas equações de regressão. Observou-se efeito ($P < 0,05$) da interação inoculante x período de fermentação sobre o pH das silagens. Observa-se maior valor ($P < 0,05$) de pH para a silagem inoculada com a cepa M17 em relação ao inoculante comercial no primeiro dia, enquanto que do 3º ao 14º dia não foi observada nenhuma diferença entre o pH das silagens. Essa diferença foi, possivelmente, causada pela presença de um meio rico em substratos no

inoculante comercial, que quando diluído em água, favorece o rápido crescimento das BAL e consequente queda do pH. Aos 56 dias de fermentação foram registrados menores ($P<0,05$) valores de pH nas silagens tratadas com M17 e no controle, que não diferiram entre si ($P>0,05$).

No entanto, todas as silagens apresentaram valores de pH, dentro do preconizado por McDonald et al. (1991), como sendo ideal para uma boa fermentação. Observou-se efeito ($P<0,05$) quadrático de período de fermentação sobre o pH estimando-se valores de pH mínimos de 3,60; 3,76 e 3,59 aos 34,51; 24,43 e 30,54 dias para as silagens controle, Sil All C4 e M17, respectivamente. Os valores de pH encontrados nesse experimento são inferiores aos observados por Pereira et al. (2005); Mari et al. (2005); Santos (2007); Bernardes et al. (2009) e Ávila et al. (2009), em silagens de gramíneas tropicais. Essa variação se deve às diferentes condições de ensilagem entre os experimentos. Considera-se que a ensilagem em *bags* simula as condições ideais do processo, uma vez que ocorre completa exclusão de oxigênio, diferentemente do que acontece em experimentos em baldes ou silos de grande porte, por exemplo.

Não houve efeito ($P>0,05$) da interação inoculante x período de fermentação sobre o teor de $N-NH_3$. No entanto, observou-se efeito ($P<0,05$) de inoculante e período de fermentação. Observou-se menor teor de $N-NH_3$ (%NT) na silagem controle em relação àquela inoculada com a cepa M17. Esse comportamento, de certa forma, não era esperado. No entanto, isso pode ser reflexo do pH muito próximo entre as silagens. Além disso, a população autóctone de BAL na silagem controle apresentou valores superiores a $5 \log \text{UFC g}^{-1}$, preconizados por Muck (1996) como mínimo necessário para assegurar uma boa fermentação e evitar a produção de $N-NH_3$ pela proteólise.

As concentrações de $N-NH_3$, variando de 4,21(Sil All, 1 dia de fermentação) a 7,10 (M17, 56 dias de fermentação), são inferiores às encontradas na literatura em silagens de gramíneas tropicais (Pereira et al., 2007; Santos, 2007; Bernardes et al., 2009; Cezário, 2011). Segundo critérios estabelecidos por McDonald et al. (1991) e Henderson (1993), silagens são consideradas satisfatórias, aceitáveis ou de baixa qualidade, quando os teores de $N-NH_3$ são menores que 10%, entre 10 e 15% e acima de 20%, respectivamente. Considerando-se os teores de MS, pH e $N-NH_3$, observa-se

que todas as silagens sofreram adequado perfil fermentativo resultando, assim, em silagem de boa qualidade.

Tabela 3- Perfil fermentativo de silagens de capim-marandu tratadas com inoculante microbiano nos diferentes períodos de fermentação e suas respectivas equações de regressão

Equações de Regressão								
pH								
Inoculante	1 dia	3 dias	7 dias	14	28	56	Média	CV
Controle	4,28ab	3,96a	3,77a	3,75a	3,78ab	3,98b		
Sill-All	4,21b	3,90a	3,76a	3,74a	3,88a	4,21a		1,66
M17	4,37a	3,95a	3,78a	3,72a	3,70b	3,98b		
N-NH ₃ (% N total)								
Controle	4,21	5,06	5,06	5,90	6,15	6,40	5,46b	
Sil-All	4,42	5,38	5,20	6,16	6,59	6,86	5,77ab	6,70
M17	4,41	5,27	5,53	6,05	6,83	7,10	5,86a	
Equação de regressão								R ²
pH								
Controle	$\hat{Y}= 4,115451 - 0,029609X + 0,000429X^2$							0,60
Sil-All	$\hat{Y}= 4,043303 - 0,023261X + 0,000476X^2$							0,63
M17	$\hat{Y}= 4,175672 - 0,038361X + 0,000628X^2$							0,66
N-NH ₃ (% N total)								
$\hat{Y}= 5,011118 + 0,037869X$							0,75	

Na Tabela 4, encontram-se as variações nas populações de bactérias do ácido láctico (BAL), enterobactérias (ENT), fungos e leveduras (F/L) nas silagens, nos diferentes períodos de fermentação.

Tabela 4 - População de bactérias do ácido lático (BAL), enterobactérias (ENT), fungos e levedura em silagem de capim-marandu tratadas com inoculante microbiano nos diferentes períodos de fermentação e suas respectivas equações de regressão

Respostas das Equações de Regressão									
BAL (log UFC g ⁻¹)									
Inoculante	0	1 dia	3 dias	7 dias	14	28	56	Média	CV
Controle	6,15	8,30a	8,43a	8,45a	8,86a	7,82a	8,78a		
Sill-All		8,40a	8,68a	8,49a	8,96a	8,13a	8,92a		2,05
M17		8,74a	8,06b	8,45a	8,89a	8,03a	8,85a		
Enterobactérias (log UFC g ⁻¹)									
Controle	6,84	7,98	3,74	ND	ND	ND	ND		
Sil-All		7,85	3,11	ND	ND	ND	ND		
M17		7,87	3,19	ND	ND	ND	ND		
Fungos e Leveduras (log UFC g ⁻¹)									
Controle	3,28	4,07	4,28	3,52	3,53	3,33	4,40	3,91a	
Sil-All		3,84	3,80	2,86	2,86	3,43	2,95	3,35b	11,35
M17		3,75	3,68	2,56	2,56	2,90	3,39	3,19b	
Equação de regressão									R ²
BAL									
Controle	$\hat{Y}= 8,765254 - 0,042506X + 0,000747X^2$								0,37
Sil-All	$\hat{Y}= 8,662980 - 0,018325X + 0,000391X^2$								0,22
M17	$\hat{Y}= 8,570739 - 0,02065X + 0,000444X^2$								0,19
Fungo e Leveduras									
	$\hat{Y}= 3,879787 - 0,059544X + 0,000982X^2$								0,68

Ao avaliar o efeito de período de fermentação dentro de inoculante, constataram-se diferenças ($P < 0,05$) entre os inoculantes somente no terceiro dia de fermentação, registrando-se menor população de BAL na silagem inoculada com a cepa M17. Observa-se aumento de 2 log UFC g⁻¹, nas primeiras 24 horas de ensilagem, em todas as silagens. Esse aumento na população de BAL se deve, provavelmente, a reativação de células dormentes e não culturáveis durante o processo de picagem, e não pela inoculação contínua por equipamentos de colheita ou crescimento da população epifítica de BAL, como assumido em pesquisas iniciais (Woolford, 1984; McDonald et al., 1991). Observou-se efeito ($P < 0,05$) do período de fermentação na população de bactérias do ácido lático, cujos dados se ajustaram ao modelo quadrático com pontos de máximo de 8,16; 8,45 e 8,79 log UFC, nos

períodos de 28; 23; e 23 dias para as silagens controle, Sill All e M17, respectivamente. Observa-se que as silagens inoculadas alcançaram maior população de BAL em menor tempo, porém essa maior população de BAL não refletiu em menor pH das silagens inoculadas.

A diminuição da população de enterobactérias a partir do 3º dia de fermentação e a não quantificação desse grupo microbiano a partir do 7º dia, nas diferentes silagens reflete, provavelmente, o baixo pH das silagens. Segundo Pahlow et al. (2003), a rápida acidificação inicial é a chave para o controle do crescimento de enterobactérias e costrídios, os quais podem crescer até que uma concentração inibitória de ácidos não dissociados e, ou, um pH suficientemente baixo, sejam atingidos. A população de enterobactérias e sua taxa de declínio podem ser utilizadas como bons indicadores da qualidade da silagem. Melhor do que qualquer outro parâmetro, sua redução na silagem reflete a presença combinada de boas condições de ensilabilidade, incluindo disponibilidade de nutrientes e água, eficiente conversão desses nutrientes em produtos da fermentação e baixo pH pelas BAL (Pahlow et al., 2003). As enterobactérias competem com as BAL por carboidratos disponíveis, principalmente durante a fase inicial de fermentação. De acordo com Seale (1986), as enterobactérias iniciam a produção de amônia através de variadas reações de deaminação e comprometem severamente a redução do pH.

Comportamento semelhante foi verificado por Meeske et al. (1999) em silagem de gramínea, cuja população de enterobactérias atingiu valor máximo nas primeiras 24 horas de fermentação ($7,1 \log \text{ UFC g}^{-1}$). No entanto, na literatura, registra-se a presença desses microrganismos até os 28 dias de fermentação (Oliveira et al., 2007; Souza et al., 2006). Além da competição por substratos com as BAL, algumas espécies de ENT são potencialmente patogênicas, como a *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* que provocam desarranjos intestinais, mastites e aborto espontâneo (Brenner, 1984; McDonald et al., 1991).

Não se observou efeito da interação inoculante x período de fermentação sobre a população de fungos e leveduras. No entanto, detectou-se efeito de inoculante e de período sobre a população desses microrganismos. Observou-se efeito quadrático ($P < 0,05$) sobre a população desses microrganismos, estimando-se população máxima de $2,98 \log \text{ UFC g}^{-1}$, aos 30 dias de ensilagem. Segundo Pahlow et al. (2003), o

desenvolvimento das populações desses microrganismos está, principalmente, associado com a presença de oxigênio, de modo que na ausência deste a população se manteve praticamente inalterada. Observou-se maior ($P < 0,05$) população de fungos e leveduras na silagem controle em relação às silagens inoculadas com BAL. Porém, essa diferença na população de F/L não foi suficiente para comprometer a qualidade da silagem, podendo ser comprovado pelos baixos valores de pH e $N-NH_3$. Os valores encontrados neste experimento estão próximos da média ($3,3 \log \text{ UFC g}^{-1}$) encontrada por Zopollato et al. (2009), ao compararem as populações de fungos e leveduras encontradas em silagem de gramíneas. Penteado et al. (2007) encontraram em silagem de capim-mombaça inoculado com *L. plantarum* populações de fungo e leveduras de $5,3 \log \text{ UFC g}^{-1}$ na planta, que se mantiveram até os 28 dias de fermentação ($3,3 \log \text{ UFC g}^{-1}$).

4. Conclusão

As silagens avaliadas podem ser consideradas de boa qualidade, com base nas características avaliadas.

A população autóctone de BAL foi suficiente para suportar rápida redução do pH e estabilização da massa ensilada comprometendo, assim, a ação dos inoculantes microbianos.

Referências Bibliográficas

AGRIPOINT. 2007. Pesquisa Top BeefPoint de confinamentos: Os 50 maiores confinamentos do Brasil em 2006. http://wm.agripoint.com.br/imagens/banco/beefpoint/Top50_2006_07.pdf

ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; SCHWAN, R. F. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 384-394, 2009.

BERNARDES, T. F.; AMARAL, R. C.; NUSSIO, L. G. Sealing strategies to control the top losses in horizontal silos. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION**. 1 ed. Piracicaba: FEALQ, 2009, v. 1, p. 209-224.

BOLSEN, K.K., ASHBELL, G., WILKINSON, J.M. Silage additives. In: WALLACE, J., CHESSON, A. (Ed.) **Biotechnology in animal feeds and animal feeding**. New York: VCH Weinheim. p.33-54, 1995.

BOLSEN, K.K.; LIN, C.; BRENT, B.E. et al. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.11, p.3066-3083, 1992.

BRENNER, D.J. Family 1. *Enterobactriaceae*. In: KRIEG, N.; HOLT, J. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p.409-498.

CEZARIO, A.S. **Perdas na ensilagem e desempenho de bovinos de corte suplementados com dietas contendo silagem de capim-marandu em duas idades de rebrotação com inoculante bacteriano**. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, Tese de doutorado, 2011.

CORRÊA, L.A.; POTT, E.B.; CORDEIRO, C.A. Integração de pastejo e uso de silagem de capim como estratégia na produção de bovinos de corte. In: Simpósio de produção de gado de corte, 2., 2001, Viçosa, MG. **Anais...** Vicosa, MG: SIMCORTE, 2001. p.159-185.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1. pacote computacional).

HENDERSON, N. Silage additives. **Animal Feed Science and Technology**. v.45, p.35-56, 1993.

HILL, G.M & HUTLEY, P.D. Digestibility protein metabolism and ruminal degradation of beagle 82 triticale and kline barley fed in corn based cattle diets. **Journal of Animal Science**, v.67, n.7, p. 1793-1804. 1989.

MARI, L. J.; NUSSIO, L. G.; RIBEIRO, J. L. Perfil fermentativo das silagens de capim-marandu (*Brachiaria brizantha*, stapf. Cv. Marandu) colhido em intervalos entre cortes fixos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2005 (CD-ROM).

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

MEESKE, R., H.M. BASSON and C.W. CRWYAGEN. The effect of a lactic acid bacterial inoculant with enzymes on the fermentation dynamics, intake and digestibility of *Digitaria eriantha* silage. **An. Feed Sci.Techn.**, v.81, p. 237-248, 1999.

MUCK, R. E., KUNG, Jr. L. Effect of silage additives on ensiling. In Silage: Field to Feedbunk **[NRAES-99]** p.187-199, Ithaca, NY: Northeast Regional Agricultural Engineering Service.

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

MUCK, R.E. & SHINNERS, K.J. Conserved forage (silage and hay): Progress and priorities. International Grassland Congress, 19, 2001, São Pedro. **Anais...** São Pedro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. Cd rom.

MUCK, R.E. Improving alfalfa silage quality with inoculants and silo management. In: Annual Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. **Proceedings...** Syracuse, NY; Cornell University, 70. p.137-146, 2008.

MUCK, R.E. The role of silage additives in making high quality silage. In: Silage production from seed to animal. **Proceedings...** New York: NRAES, 67, p. 106-116, 1993.

OLIVEIRA, A.C., A.J.V. PIRES, H.C. OLIVEIRA, N.M.S. PATÊS, N.C. FONCECA, G.G.P. CARVALHO., A.B. OLIVEIRA. Composição nitrogenada de silagens de gramíneas tropicais tratadas com uréia. **Arch. Zootec.**, v.56, p.15-21, 2007.

PAHLOW, G.; MUCK,R.E.; DRIEHUIS, F. Microbiology of ensiling. In: SILAGE SCIENCE AND TECHNOLOGY. Madison. **Proceedings...** Madison: ASCSSA-SSSA, Agronomy 42, 2003. p. 31-93.

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

PEREIRA, O. G.; SOUSA, L. O.; PENTEADO, C. S. Populações microbianas, pH e relação nitrogênio amoniacal/N total em silagens de capim-elefante com diferentes idades de rebrotação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., Goiânia **Anais...** Goiânia, 2005 (CD-ROM).

PEREIRA, O.G.; RIBBEIRO, K.G.; OLIVEIRA, A.S. Produção e utilização de silagem de capim no brasil. IN: Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem, 5., Viçosa, **Anais...** Viçosa. 2008.

PEREIRA, O.G.; ROCHA, K.D.; FERREIRA, C.L.L.F. Composição química, caracterização e quantificação da população de microrganismos em capim-elefante cv. Camerron (*Pennisetum purpureum* Schum.) e suas silagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p. 1742-1750, 2007.

ROCHA, K.D. **Silagens de capim-elefante cv. Cameroon, de milho e de sorgo produzidas com inoculantes enzimo-bacterianos: populações microbianas, consumo e digestibilidade.** Dissertação de mestrado em Zootecnia. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. p. 93. 2003.

RODRIGUES, P.H.M., SENATORE, A.L., LUCCI, C. DE S., ANDRADE, S.J.T., LIMA, F.R. DE., MELOTTI, L. Valor nutritivo de silagens inoculadas com bactérias ácido lácticas. 2. Inoculação da silagem de sorgo. REUNIÃO DA SOCIEDADE

BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:SBZ, 2001. P.918-919.

SANTOS, E.M. ; PEREIRA, O.G. ; ROSA, L.O. Perfil fermentativo e composição bromatológica de silagens de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* cv. Basilisk) de diferentes idades de rebrotação. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 44., 2007, Jaboticabal. **Anais...** SBZ, 2007.

SANTOS, E.M. **Populações microbianas e perfil fermentativo em silagens de capins tropicais e desempenho de bovinos de corte alimentados com dietas contendo silagens de capim-mombaça.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 126p. Tese (Doutorado).

SEALE, D.R. Bacterial inoculants as silage additives. **Journal of Applied Bacteriology**, Symposium Supplement, 9S-26S, 1986.

SEALE, D.R.; HENDERSON, A.R.; PETTERSON, K.O; LOWE, J.F. The effect of addition of sugar and inoculation with two commercial inoculants on the fermentation of Lucerne silage. **Grass and Forage**, v.41, p.61-79, 1986.

SILVA, D.J.; QUEIRÓZ, A.C. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos.** 3 ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.

SOUZA, L.O, E.M. SANTOS e D.C.S. PENTEADO. Composição bromatológica de silagem de capim-mombaça inoculada com *Lactobacillus plantarum* da microbiota epifítica. In: Congresso nacional de zootecnia. **Anais...** UFRPE. Recife, 2006.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, N, J. B. **Analysis of forages and fibrous food.** 1 ed. Ithaca: Cornell University, 1985, 202p.

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

VILELA, D. **Conservação de forragens.** In: EMBRAPA GADO DE LEITE:20 ANOS DE PESQUISA. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, 1997. p..93-112. 1997.

WEINBERG, Z.G; & MUCK, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Micro. Reviews**, v.19, p.53-68, 1996.

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

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSO, L. G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.170-189, 2009.

Anexos

Anexo 1 – Capim (1-Mombaça; 2- Braquiária), Dose (0,30,60,90 kg N ha⁻¹), repetição (Rep), matéria seca (MS), proteína bruta (PB), carboidratos solúveis (CHO), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), perdas por efluente (Efluente), perdas por gases (gases), amônia (N-NH₃), pH por mini silo (Capítulo 1)

Capim	Dose	Rep	MS	PB	CHO	FDN	FDA	Efluente	gases	N-NH ₃	pH
1	0	1	21,40	5,14	0,80	68,94	38,26	19,61	4,65	8,05	4,78
1	0	2	21,77	4,46	1,32	70,23	38,24	19,83	4,31	10,77	4,81
1	0	3	22,03	5,18	1,35	64,86	33,80	11,08	4,88	10,69	4,80
1	0	4	20,52	4,81	1,12	68,84	37,83	12,27	4,73	10,40	4,70
1	30	1	21,87	5,07	1,17	69,95	36,12	21,51	3,67	9,55	4,88
1	30	2	21,65	5,13	1,00	69,24	35,93	18,50	3,34	10,39	4,75
1	30	3	21,90	4,98	1,57	71,20	37,22	19,54	4,21	13,16	4,94
1	30	4	21,65	5,94	1,53	69,97	36,87	18,82	0,85	10,74	4,88
1	60	1	18,90	6,15	1,58	72,83	41,20	80,35	4,62	10,98	5,00
1	60	2	18,58	6,25	1,99	73,70	42,68	77,09	4,93	22,01	4,86
1	60	3	18,13	5,97	1,62	72,13	41,39	75,58	5,66	30,56	4,87
1	60	4	18,29	6,23	2,21	73,60	42,71	80,52	3,85	19,45	5,04
1	90	1	18,80	6,38	1,33	70,73	39,13	47,01	3,86	18,52	5,05
1	90	2	19,63	5,77	1,07	73,55	41,23	43,89	3,87	14,88	4,94
1	90	3	18,77	6,04	1,40	72,68	41,51	44,78	3,57	16,44	5,01
1	90	4	18,73	5,99	1,28	69,99	39,31	35,71	13,73	17,03	4,92
2	0	1	22,02	5,18	1,75	68,82	36,21	15,56	3,24	12,60	4,72
2	0	2	21,89	5,14	1,47	70,87	37,74	14,91	3,29	13,25	4,66
2	0	3	21,81	5,11	1,84	69,24	36,35	16,22	2,68	10,67	4,43
2	0	4	22,41	5,23	1,70	71,04	38,62	15,98	2,64	10,77	4,51
2	30	1	21,36	5,13	1,59	69,84	36,94	5,61	4,42	11,12	4,37
2	30	2	22,66	4,56	1,83	68,46	38,01	15,92	3,52	11,12	4,42
2	30	3	22,97	4,65	1,93	70,28	36,79	13,63	3,22	11,32	4,46
2	30	4	21,22	4,80	1,66	71,41	38,67	18,66	2,60	9,92	4,28
2	60	1	21,11	5,38	1,03	69,11	37,51	16,36	2,84	11,68	4,57
2	60	2	21,27	4,91	0,98	69,06	37,03	17,00	3,71	12,43	4,40
2	60	3	21,18	4,59	0,94	68,88	36,70	16,10	3,26	14,47	5,10
2	60	4	20,20	4,52	0,99	70,31	38,17	13,70	4,63	10,64	4,41
2	90	1	19,91	4,49	1,64	69,07	37,30	19,57	3,01	10,54	4,51
2	90	2	19,98	4,74	2,38	70,31	39,35	20,87	2,55	12,00	4,53
2	90	3	19,96	4,91	1,61	69,11	37,59	20,92	2,55	11,46	4,44
2	90	4	20,03	4,90	1,13	70,06	37,82	18,38	2,97	11,89	4,43

Anexo 2- Doses de estilosantes (Sty), inoculante (1-sem; 2-com), repetição (rep), cinza, proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), matéria seca (MS) por mini silo (capítulo 2)

Sty	Inoc	rep	Cinza	PB	FDN	FDA	MS
0	1	1	6,23	7,25	70,47	40,20	21,13
0	1	2	6,59	7,68	69,62	40,24	21,56
0	1	3	6,46	9,81	70,78	40,08	21,88
0	1	4	6,47	6,80	71,98	41,95	21,75
0	2	1	6,75	7,34	70,85	41,15	21,53
0	2	2	7,47	7,32	70,99	42,31	21,69
0	2	3	6,88	7,13	72,26	41,48	21,10
0	2	4	6,16	7,67	69,39	38,73	21,72
10	1	1	7,08	7,62	68,83	41,58	21,58
10	1	2	7,54	6,37	70,37	42,20	21,74
10	1	3	7,16	7,14	71,73	43,56	21,22
10	1	4	7,55	7,66	70,12	42,11	21,50
10	2	1	7,15	7,97	70,02	41,65	21,86
10	2	2	7,50	8,41	69,26	41,18	22,10
10	2	3	7,53	7,82	70,71	41,02	21,71
10	2	4	7,90	7,85	68,06	39,92	21,87
20	1	1	6,50	8,73	63,90	40,03	22,24
20	1	2	6,86	7,84	68,27	41,11	21,83
20	1	3	7,53	8,28	66,31	40,22	21,62
20	1	4	7,59	8,39	65,55	40,02	22,09
20	2	1	7,74	8,35	65,67	38,37	22,41
20	2	2	7,52	8,26	66,94	40,30	22,41
20	2	3	7,88	8,84	70,14	42,00	22,29
20	2	4	7,84	8,31	68,92	42,99	22,53
30	1	1	7,68	9,47	62,97	39,75	23,77
30	1	2	7,94	9,28	60,47	39,72	23,40
30	1	3	7,61	10,07	61,64	38,66	23,26
30	1	4	7,63	8,46	64,52	39,78	23,43
30	2	1	7,03	9,61	63,70	42,47	23,12
30	2	2	7,98	8,94	64,98	38,86	22,81
30	2	3	6,86	9,16	60,31	38,59	22,72
30	2	4	7,69	8,65	64,84	38,50	23,16

Anexo 3- Doses de estilosantes (Sty), inoculante (1-sem; 2-com), repetição (rep), recuperação de matéria seca (RMS), perdas por efluente (PE), perdas por gases (PG), população de bactéria do ácido lático (BAL), população de fungos e leveduras (FUNGO), amônia (Amonia), pH por mini silo (cap. 2)

Sty	Inoc	Rep	RMS	PE	PG	BAL	FUNGO	Amonia	pH
0	1	1	93,00	23,14	1,94	7,58	3,78	8,05	4,20
0	1	2	94,35	25,15	2,31	7,18	3,95	13,44	3,91
0	1	3	94,70	27,24	3,13	7,34	3,85	10,05	3,94
0	1	4	92,25	27,82	8,45	7,56	2,71	17,50	4,24
0	2	1	93,21	25,94	3,94	7,71	2,18	15,20	4,00
0	2	2	93,87	26,51	4,60	7,65	1,85	15,62	4,00
0	2	3	90,25	33,87	4,03	7,92	2,11	17,15	4,20
0	2	4	93,91	32,23	1,84	7,72	2,00	14,43	4,02
10	1	1	97,34	21,15	2,40	7,79	2,11	14,40	4,04
10	1	2	97,05	24,02	2,39	7,38	4,18	17,24	4,02
10	1	3	93,98	19,73	3,02	7,62	2,15	15,92	4,15
10	1	4	97,02	18,87	3,13	7,53	2,18	13,39	4,00
10	2	1	98,53	4,72	2,50	7,56	2,11	14,32	4,33
10	2	2	97,56	20,54	2,51	7,61	2,38	11,23	4,03
10	2	3	97,42	6,15	4,28	7,73	2,26	12,72	4,29
10	2	4	96,44	20,80	3,18	7,72	2,43	14,58	4,29
20	1	1	96,36	15,95	2,47	7,45	2,20	12,40	3,99
20	1	2	94,67	7,75	1,80	7,86	2,26	13,72	4,06
20	1	3	95,54	7,73	2,39	7,81	4,28	13,77	4,22
20	1	4	95,46	18,35	2,36	8,14	4,11	11,66	4,19
20	2	1	97,41	14,31	2,46	7,85	2,26	11,53	4,08
20	2	2	96,91	15,20	1,96	7,93	4,32	13,51	4,19
20	2	3	96,02	14,13	4,25	8,03	4,18	12,69	4,29
20	2	4	97,70	13,83	1,12	7,79	2,32	12,03	4,08
30	1	1	98,37	10,75	2,25	8,14	4,11	10,70	4,00
30	1	2	97,75	11,58	2,65	7,84	2,30	9,45	3,85
30	1	3	96,69	11,36	1,79	7,91	2,49	9,53	3,86
30	1	4	96,90	9,72	3,57	7,96	4,32	10,87	3,89
30	2	1	95,86	13,35	2,72	8,06	4,43	10,77	3,96
30	2	2	93,61	14,31	2,92	7,90	4,40	11,02	4,03
30	2	3	94,89	14,13	2,30	8,12	4,45	10,24	3,82
30	2	4	96,24	14,52	2,37	7,97	4,30	11,92	4,09

Anexo 4 – Inoculante (1-controle; 2-Sil All C4; 3-M17), repetição (rep), tempo de fermentação (tempo), pH, amônia (amonia), população de bactéria do ácido lático (bal), população de fungo e levedura (fungo) por bag (Capítulo 3)

Inoc	Rep	tempo	pH	amonia	bal	fungo
1	1	1	4,26	4,04	8,73	4,08
1	2	1	4,30	4,04	8,72	4,08
1	3	1	4,27	4,55	8,75	4,04
2	1	1	4,21	4,42	8,72	3,90
2	2	1	4,21	4,42	7,79	3,85
2	3	1	4,22	4,42	8,82	3,78
3	1	1	4,32	4,15	8,73	3,60
3	2	1	4,38	4,67	8,75	3,60
3	3	1	4,40	4,41	8,76	4,04
1	1	3	3,94	4,80	8,43	4,34
1	2	3	4,00	5,31	8,53	4,30
1	3	3	3,95	5,06	8,34	4,20
2	1	3	3,91	5,47	8,70	4,04
2	2	3	3,89	5,20	8,64	3,78
2	3	3	3,91	5,47	8,69	3,60
3	1	3	3,96	5,18	7,85	3,00
3	2	3	3,95	5,44	8,15	3,85
3	3	3	3,94	5,18	8,18	4,20
1	1	7	3,76	5,06	8,53	4,30
1	2	7	3,77	5,06	8,53	3,53
1	3	7	3,78	5,06	8,30	3,70
2	1	7	3,76	5,47	8,49	3,00
2	2	7	3,75	5,20	8,43	2,85
2	3	7	3,77	4,94	8,54	3,70
3	1	7	3,76	5,18	8,49	2,78
3	2	7	3,83	5,44	8,43	2,85
3	3	7	3,76	5,96	8,43	2,90
1	1	14	3,71	5,81	8,83	2,95
1	2	14	3,70	5,81	8,78	4,15
1	3	14	3,85	6,07	8,96	3,48
2	1	14	3,75	6,51	9,04	2,86
2	2	14	3,76	5,73	8,94	2,85
2	3	14	3,72	6,25	8,91	2,86
3	1	14	3,71	5,96	8,99	2,81
3	2	14	3,71	6,22	8,87	2,77
3	3	14	3,73	5,96	8,81	2,11

Anexo 4 – Inoculante (1-controle; 2-Sil All C4; 3-M17), repetição (rep), tempo de fermentação (tempo), pH, amônia (amonia), população de bactéria do ácido láctico (bal), população de fungo e levedura (fungo) por bag (Capítulo 3)

oc	Rep	tempo	pH	amonia	bal	Fungo
1	1	28	3,92	5,56	7,83	3,95
1	2	28	3,69	6,32	7,91	3,20
1	3	28	3,72	6,57	7,72	2,85
2	1	28	3,91	6,77	8,13	3,08
2	2	28	3,84	7,03	8,08	4,08
2	3	28	3,89	5,99	8,17	3,15
3	1	28	3,70	6,48	7,94	2,85
3	2	28	3,67	6,48	8,05	3,00
3	3	28	3,74	7,52	8,09	2,85
1	1	56	3,98	5,79	8,98	3,67
1	2	56	3,90	6,58	8,68	4,54
1	3	56	4,06	6,84	8,68	5,00
2	1	56	4,00	7,04	8,86	2,85
2	2	56	4,34	7,31	9,24	2,85
2	3	56	4,29	6,23	8,65	3,15
3	1	56	4,06	6,75	8,88	4,00
3	2	56	3,93	6,75	8,89	3,23
3	3	56	3,94	7,82	8,79	2,95