



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

**Seleção de inoculante bacteriano para produção de
silagem de capim Piatã *L. Plantarum* e *L. Brevis***

Acadêmico (a): Edevânia Teixeira Gomes

Dourados – MS
Agosto/2017



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

Seleção de inoculante bacteriano para produção de silagem de capim Piatã *L. Plantarum* e *L. Brevis*

Acadêmico (a): Edevânia Teixeira Gomes
Orientador (a): Prof. Dr^a. Danielle Marques Vilela

Artigo escrito seguindo as normas de publicação da revista Ciência e Agrotecnologia, apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias, como defesa de Trabalho de Conclusão de Curso, para obtenção do Título de Bacharel em Zootecnia, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Danielle Marques Vilela.

Dourados - MS
Agosto/2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

G631s	<p>Gomes, Edevânia Teixeira. Seleção de inoculante bacteriano para produção de silagem de capim Piatã <i>L. Plantarum e L. Brevis</i> . / Edevânia Teixeira Gomes. – Dourados, MS : UFGD, 2017. 21f.</p> <p>Orientadora: Prof. Dra. Danielle Marques Vilela. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Brachiaria brizantha . 2. Fermentação. 3. Inoculante. 4. Silagem. I. Título.</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Seleção de inoculante bacteriano para produção de silagem de capim Piatã
Lactobacillus plantarum e *Lactobacillus brevis*

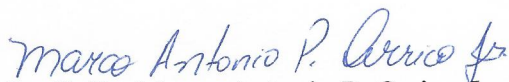
AUTORA: Edevânia Teixeira Gomes

ORIENTADORA: Danielle Marques Vilela

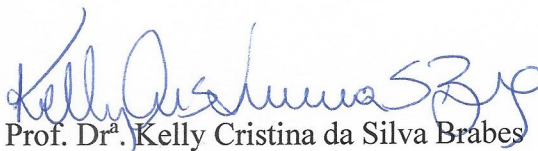
Aprovado como parte das exigências para a obtenção do grau de bacharel em
ZOOTECNIA pela comissão examinadora.



Prof. Dr^a. Danielle Marques Vilela
(Orientadora)



Prof^o. Dr. Marco Antonio P. Orrico Junior



Prof. Dr^a. Kelly Cristina da Silva Brabes

Data de realização: 10 de agosto de 2017



Prof^o. Dr. Leonardo de Oliveira Seno
Presidente da comissão do TCC-Zootecnia

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e saúde, pois as dificuldades foram muitas, mas todas superadas.

Meu obrigado eterno ao meu pai Aldemir Pereira Gomes, minha mãe Vilma Nunes T. Gomes e meu irmão Evandro Teixeira Gomes pelo amor e apoio incondicional em todas as decisões e nunca me deixaram desistir em nenhum momento.

Ao meu namorado Gustavo Borges pelo companheirismo, paciência, amor e carinho e sempre estar ao meu lado.

As minhas amigas, irmãs Maíza Biazolli, Jessica Gonçalves e Amanda Tocchetto que Deus colocou no meu caminho nesses cinco anos de graduação.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins, dando força e incentivo para seguir em frente.

A esta Universidade, corpo docente, administração, coordenação e direção pela oportunidade de me tornar Zootecnista.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Danielle Marques Vilela, pelo suporte e paciência em me passar seus conhecimentos, por suas correções e incentivos.

A todos os colegas da VI turma de Zootecnia, sem eles nada seria possível.

Obrigada a todos aqueles que participaram diretamente e indiretamente para que essa pesquisa pudesse se realizar.

“Todos os nossos sonhos podem tornar-se realidade se
tivermos a coragem de prosseguir-los”.

Walt Disney

RESUMO

O objetivo desse experimento foi avaliar o uso de três isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) como inoculantes na silagem do capim Piatã (*Brachiaria brizantha*) enriquecida com diferentes concentrações de glicerina bruta e a influência nas composições microbiológicas e químicas da silagem. Foram avaliadas três cepas de BAL selvagens que foram anteriormente isoladas do processo de ensilagem de capim Piatã e identificadas por sequenciamento do rDNA 16S. Dois dos isolados selvagens foram identificados como *Lactobacillus plantarum* e outro como *Lactobacillus brevis*. Foi feito o corte do capim, em uma lona plástica foi picado para diminuir o tamanho das partículas, pesado e misturado o inoculante com auxílio de um barrifador e depositado nos canos de PVC (minisilos), feito a compactação e vedação com lona plástica e fita adesiva, pesados e armazenados no laboratório. Após o período de fermentação os minisilos foram abertos e retiradas amostras para a contagem microbiológica e análises químicas. As variáveis cinzas, pH final e perdas de efluentes apresentaram diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). O restante de variáveis analisadas, como proteína bruta (PB), matéria seca (MS), poder tampão, pH inicial, perdas de gases e perdas matéria seca não se diferiram estatisticamente, mas apresentaram algumas interações, sendo assim, são promissoras para uso em silagem de capins tropicais.

Palavras-chave: *Brachiaria brizantha*, fermentação, inoculante, silagem.

ABSTRACT

The objective of this experiment was to evaluate the microbiology and chemicals quality of grass Piatã (*Brachiaria brizantha*) silage enriched with different doses of crude glycerin and inoculated with new strains of lactic acid bacteria (LAB) selected to this forage. Was evaluated three strains of wild LAB which were previously isolated from the Piatã grass ensiling process and identified by 16S rDNA sequencing. Two of isolated strains of wild were identified as *Lactobacillus plantarum* and other as *Lactobacillus brevis*. Was made cut of grass, over a plastic canvas was chopped to decrease the particle size, heavy and mixed the inoculant with help of a spray bottle and deposited on PVC pipes (small silos), done compaction and sealing with plastic canvas and scotch tape, heavy and stored in the laboratory. After fermentation period the small silos was open and withdrawals sample for count microbiology and chemicals analyzes. The variables mineral matter, pH end and effluents loss presented statistical differences by Tukey test (5% probability). The remaining variables analyzed as crude protein (CP), dry matter (DM), mineral matter, pH initial, gases loss dry matter loss not presented statistical differences, but was presented some interactions, therefore are promising for use at tropical grass silage.

Key-words: *Brachiaria brizantha*, fermentation, inoculant, silage

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
INTRODUÇÃO.....	7
MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
2.1. Características bioquímicas dos inoculante.....	9
2.2. Condições da forragem e ensilagem.....	9
2.3. Análises microbiológica e bromatológicas.....	11
2.4. Análises estatísticas.....	11
RESULTADOS.....	12
3.1. Características bioquímicas e moleculares das espécies testadas.....	12
3.3. Análises químicas.....	13
4. DISCUSSÕES.....	15
CONCLUSÕES.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento experimental com os respectivos tratamentos, concentração de glicerol e os diferentes inoculantes.....	10
Tabela 2. Características bioquímicas e identificação molecular dos 3 isolados de BAL testados.....	12
Tabela 3- Análises químicas da forragem fresca (pH inicial) e da silagem, e teste t para análise estatística dos tratamentos com (4%) e sem (0%) glicerol.....	14

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contagens populacionais de BAL, BMT, FF e LEV dos tratamentos enriquecidos com diferentes doses de inoculantes e glicerol.....	13
---	----

1. INTRODUÇÃO

A *Brachiaria brizantha* cv. Piatã foi lançada pela Embrapa em 2006, como um dos materiais mais esperados pela agropecuária brasileira, por ser uma gramínea recomendada para diversificação das pastagens em vários tipos de cultivo, destacando-se pela alta taxa de crescimento foliar, alta relação folha/caule e valor nutritivo. Uma cultivar adaptada a solos de média e boa fertilidade das zonas tropicais brasileiras, apresenta boa resposta à adubação, tolerância a fungos foliares e de raiz e boa resistência a cigarrinha (Embrapa, 2014). As gramíneas forrageiras tropicais, de maneira geral, possuem alta produção por área, porém seu valor nutritivo tende a diminuir com o avanço do estado fisiológico, conseqüentemente, o produto obtido no processo de ensilagem também será de menor valor nutritivo se for colhido tardiamente (SILVEIRA, 2015).

Para melhorar a qualidade do processo e do produto final é frequente o uso de aditivos estimulantes e nutrientes complementares junto à forrageira (MCDONALD et al., 1991). E o uso do glicerol, produto derivado da glicerina bruta está sendo utilizado como estimulador de fermentação, por ser uma fonte de baixo custo e que podem auxiliar na conservação do alimento. No entanto, com a ampliação de sua produção, há também o aumento da geração de um coproduto de potencial poluidor chamando de glicerina bruta, uma vez que a cada 100 litros de biodiesel são gerados cerca de 10 litros deste resíduo (LARSEN et al., 2013).

A ensilagem é uma técnica utilizada para conservação de forragem que tem sido amplamente utilizado com a finalidade de produção de alimento volumoso (silagem) de boa qualidade, durante o período de baixa produção, permitindo o aproveitamento do excesso de forragens do período das águas para fornecimento aos animais, durante o período seco, quando ocorre uma diminuição qualitativa e quantitativa das forrageiras. O principal objetivo da ensilagem é maximizar a preservação original dos nutrientes encontrados na forragem fresca, durante o armazenamento, com o mínimo de perdas de matéria seca e energia (Pereira et al., 2006).

O uso de aditivos microbiológicos em silagens tem o objetivo de inibir o crescimento de micro-organismos aeróbios (especialmente aqueles associados com instabilidade aeróbia, ex. leveduras, *Listeria*), inibir o crescimento de organismos anaeróbios indesejáveis como enterobactérias e clostrídeos, inibir a atividade de proteases e deaminases da planta e de microrganismos, adicionar microrganismos benéficos para dominar a fermentação, formar produtos finais benéficos para estimular o consumo e a produção do animal e melhorar a

recuperação de matéria seca da forragem conservada (Kung Jr. et al., 2003). De acordo com Rotz & Muck (1994), os aditivos bacterianos têm como função aumentar a população de bactérias lácticas e incrementar a taxa de fermentação pelo uso mais eficiente dos carboidratos solúveis, elevando a produção de ácido láctico e reduzindo o pH e o teor de N-NH₃. Os inoculantes microbianos ainda visam melhorar o desempenho animal: produção de leite e ganho de peso por eficiência na alimentação (WEINBERG; MUCK, 1996).

Esse experimento teve como objetivo avaliar o uso de três isolados de bactérias ácido lácticas como inoculantes na silagem do capim Piatã enriquecida com diferentes concentrações de glicerina bruta e a influência nas composições microbiológica e químicas da silagem.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Características bioquímicas dos inoculante

Lactobacillus brevis e *L. plantarum* testadas neste trabalho pertence à coleção de micro-organismos do Laboratório de Bioquímica da UFGD/FCBA e foram obtidas a partir do processo de ensilagem de capim Piatã.

Bioquimicamente caracterizadas por padrões de fermentação de açúcar usando galactose, glicose, frutose, manose, manitol, sorbitol, celobiose, maltose, lactose, sacarose, rafinose. A produção de gás foi avaliada com fermentação obtidas em caldo MRS (De Man, Rogosa, Sharpe, Oxoid CM361, Basingstoke, Hamp-shire, Inglaterra) um tubo de Durham, de acordo com Chao et al. (2008). Essas estirpes foram identificadas pelo sequenciamento do rDNA 16S. As estirpes foram inoculados em placas de agar de MRS durante 24 h a 30°C e recolheu-se com uma ponta de pipeta e ressuspendeu em 40µL de tampão de PCR. Para atingir o modelo de DNA, a suspensão foi aquecida durante 10 minutos a 95°C e utilizou-se 2µL em experiências de PCR para amplificar a região 16S de comprimento total. Um fragmento de aproximadamente 1500pb do rDNA 16S foi amplificado usando o iniciador direto 27f (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e o iniciador inverso 1512r (5'ACGGCTACCTTGTTACGACT3'). Os produtos de PCR foram selecionados usando um ABI3730 XL DNA analisador (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As seqüências foram comparadas ao banco de dados GenBank usando o algoritmo BLAST (National Center for Biotechnology Information, Maryland, EUA).

Para produção dos inóculos os isolados foram cultivados em caldo MRS com transferências sucessivas até atingir a população de 7 log UFC.mL⁻¹. Nos mini silos foi utilizado uma proporção de 0,5 g de inoculante para 1,5 kg de capim.

2.2. Condições da forragem e ensilagem

O experimento foi desenvolvido no setor de Forragicultura e as análises bromatológicas no Laboratório de Manejo de Resíduos Agropecuários da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x4, sendo duas doses de glicerol (0% e 4% de MS), e quatro diferentes inoculantes (0,1,2,3), onde o tratamento zero não possuía nenhum inoculante ou seja, o

tratamento testemunha, já os restantes possuía diferentes cepas de BAL (1 e 2- *L. plantarum*; 3- *L. brevis*) (Tabela 1).

Tabela 2 – Delineamento experimental com os respectivos tratamentos, concentração de glicerol e os diferentes inoculantes.

TRATAMENTOS	CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL	INOCULANTES
1	0% MV	Controle
2	0% MV	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>
3	0% MV	<i>Lactobacillus plantarum 2</i>
4	0% MV	<i>Lactobacillus brevis</i>
5	4% MV	Controle
6	4% MV	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>
7	4% MV	<i>Lactobacillus plantarum 2</i>
8	4% MV	<i>Lactobacillus brevis</i>

A área de capim Piatã utilizada no experimento foi adubada 90 dias antes do início do experimento com 100 kg/ha⁻¹ de nitrogênio (uréia). Foi realizado um corte de uniformização do capim a 10 cm do solo para padronizar a pastagem. Todos os cortes foram feitos com uma roçadeira costal a uma altura de 15 cm do solo e a massa coletada foi triturada para obter um tamanho de partícula de 1,5 cm.

No capim, a dose de glicerina de cada tratamento e o inoculante foram misturados sobre uma lona plástica. Os isolados foram inoculados com o auxílio de um borrifador para garantir o espalhamento uniforme sobre 1,5 kg/MV. A glicerina utilizada apresenta a seguinte composição química: 14% de glicerol, 6,1 % de metanol, 96 % de matéria seca e 70,3 % de extrato etéreo.

Os mini silos utilizados no experimento são de cano PVC com 50 cm de altura e 15 cm de diâmetro, comportando uma quantidade de aproximadamente 1,5 kg de capim “in natura”. A compactação do material a ser ensilado foi realizada manualmente e a densidade média observada foi de 566 kg/MV/m³, e armazenado em temperatura ambiente e sob a proteção de luz solar e chuvas. Após o enchimento, os minis silos foram vedados com lona plástica e fita adesiva, pesados e armazenados no laboratório.

2.3. Análises microbiológicas e químicas

Ao final dos 80 dias de fermentação, os minis silos foram abertos e amostras coletadas assepticamente para a realização das análises microbiológicas e bromatológicas. Amostras compostas de 20 g da silagem de cada tratamento foram colocadas assepticamente em frascos contendo 180 mL de água peptonada estéril (1% de peptona) e agitada durante 20 minutos. A partir do extrato obtido, foram preparadas diluições decimais seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} .

A contagem de BAL foi realizada em meio *MRS* acrescido de nistatina (0,4%) e as placas incubadas a 30°C por 48 horas. O meio *YEPG* [(0,3% de extrato de levedura (Merck); 0,3% extrato de malte (Merck); 0,5% de peptona (Himedia); 1,0% glicose (Merck); 2,0% ágar (Merck) por litro, contendo 100 mg de cloranfenicol (Sigma, St. Louis, USA)] com pH 3,5 para a contagem de leveduras, sendo as placas incubadas 28°C por 48h. O meio de cultura DG18 (*Dichloran glycerol*) da marca Acumedia, foi utilizado para a contagem de fungos filamentosos e as placas foram incubadas a 28°C por 24 a 72h. Para a contagem de bactérias mesófilas totais foi utilizado o meio Ágar Nutriente - Kasvi (Extrato de carne:1g/L; extrato de levedura:2g/L; peptona:5g/L; cloreto de sódio:5g/L; agar:15hg/L; pH final: 6,8 + 0,2 a 25°C) e as placas incubadas a 35°C por 24-48h.

Todos os componentes dos minis silos, assim como a forragem acondicionada, foram pesados para determinação das perdas fermentativas. Após o período de fermentação, foram novamente pesados para determinação das perdas por gases e perda de MS (Jobim et al. 2007).

Foi coletado amostras de aproximadamente 300 g de silagem de cada tratamento, foi submetida à pré-secagem a 55°C por 72 horas. Depois da pré-secagem as amostras foram moídas em moinho tipo Willye com peneira de 1 mm e então foram submetidas às análises laboratoriais. Os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e cinzas (CZ) foram determinados de acordo com (AOAC, 1990).

O pH inicial foi mensurado no momento da ensilagem. O pH final após o período de fermentação, quando os minis silos foram abertos. O poder tampão foi determinado nas amostras de forragem conforme protocolo descrito por (Playne & Mcdonald, 1966).

2.4. Análises estatísticas

Os dados foram analisados estatisticamente, utilizando o programa SAEG 9.2 Sistema para Análises Estatísticas, aplicando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade na comparação das médias. E o teste t (Student) para o uso ou não de glicerol também a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Características bioquímicas e moleculares das espécies testadas

Os três isolados de BAL foram submetidos à testes de fermentação de carboidratos, teste de produção de gases e também foram identificados por sequenciamento da região 16S rDNA (Tabela 2).

Tabela 2. Características bioquímicas e identificação molecular dos 3 isolados de BAL testados.

Carboidratos	<i>L. plantarum</i> 1	<i>L. plantarum</i> 2	<i>L. brevis</i>
Identificação molecular (98% de similaridade)	KC422323	LBA16SRRN1	EF412995
Galactose	+	+	+
Glicose	+	+	+
Frutose	+	+	+
Manose	+	+	-
Manitol	+	+	-
Sorbitol	+	+	-
Celobiose	+	+	-
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Sacarose	+	-	-
Rafinose	+	+	+
Produção de gás em caldo MRS	-	-	+

As cepas de *L. plantarum* apresentaram resultados semelhantes nos testes de fermentação realizados, apenas diferindo na fermentação da sacarose, onde *L. plantarum* 2 não foi capaz de fermentar esse carboidrato e não produzir gás quando cultivadas em caldo MRS. *L. brevis* foi capaz de fermentar galactose, glicose, frutose, maltose e lactose, além de produzir gás quando cultivado em caldo MRS.

3.2. Contagens populacionais de micro-organismos nos diferentes tratamentos

Após a abertura dos minis silos uma amostra de cada tratamento foi coletada para contagem populacional de BAL, BMT, leveduras (LEV) e fungos filamentosos (FF) (Figura 1).

Nos tratamentos sem adição de glicerina as maiores contagens populacionais de BAL

forma encontradas quando se inoculou a silagem com *L. plantarum* 1 (tratamento 2), na ordem de 7,74 log UFC.g⁻¹, no entanto, a contagem de BMT foi superior (8,28 log UFC.g⁻¹). Já nos tratamentos com adição de glicerina as maiores contagens populacionais se deram quando se inoculou a silagem com *L. brevis* (tratamento 8), na ordem de 8 log UFC.g⁻¹.

Nos tratamentos onde houve o uso de inoculantes e a adição de 4% de glicerina (tratamentos 6 a 8) as contagens populacionais de fungos filamentosos e leveduras foram inferiores, quando comparados ao controle (tratamento 5). Em relação aos tratamentos sem adição de glicerina, apenas quando se utilizou *L. brevis* como inoculante se obteve menores contagens populacionais de fungos filamentosos e leveduras, quando comparado ao controle (tratamento 1).

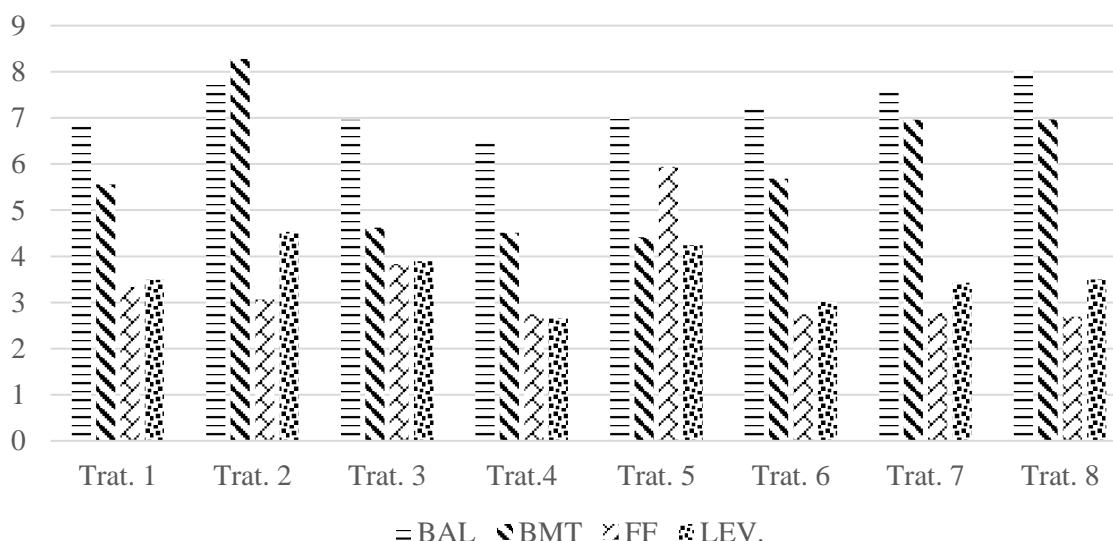


Figura 1. Contagens populacionais de BAL, BMT, FF e LEV dos tratamentos enriquecidos com diferentes doses de inoculantes e glicerol.

3.3. Análises químicas

As análises físico-químicas de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) do capim Piatã (figura 2) com inserção e sem inserção de glicerina com diferentes inoculantes, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na análise de cinzas (CZ), o tratamento sem adições de glicerina e inoculante apresentou maiores valores em relação aos demais tratamentos (Tabela 3).

Todos os tratamentos apresentaram redução nos valores de pH da matéria ensilada em relação à forragem fresca. As perdas de efluentes foram menores estatisticamente nos

tratamentos com adição de 4% glicerina e BAL, quando comparados aos tratamentos sem adição de glicerina, sendo que a redução maior na perda de efluentes foi no Trat. 8 (*L. brevis* e 4% glicerina) (Tabela 3).

Quando se utilizou *L. plantarum* 1 como inoculante (tratamento 2) se obteve redução na perda de MS no processo de ensilagem, quando comparado ao controle (11,11 para 7,51 % MS ensilada, respectivamente), mesmo não havendo diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Tabela 3).

Para os demais parâmetros analisados (poder tampão, pH inicial, perdas de gás, matéria seca, proteína bruta e perdas de MS) não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos testados, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Tabela 3).

Os parâmetros químicos de pH final, PB, cinzas, perdas de MS e efluentes se diferiram estatisticamente, ou seja, aceita-se a hipótese H1. Para o restante de parâmetros a hipótese é nula, mostrando que não faz diferença usar o glicerol, porque os resultados das médias são iguais aos tratamentos sem adição de glicerol (tabela 3).

Tabela 3- Análises químicas da forragem fresca (pH inicial) e da silagem, e teste t para análise estatística dos tratamentos com (4%) e sem (0%) glicerol.

Parâmetros químicos	Doses glicerol	Controle	<i>L.</i>	<i>L.</i>	<i>L. brevis</i>	Teste t
			<i>plantarum</i> 1	<i>plantarum</i> 2		
PT (meqg/Hcl/100gMS)	T1 (0%)	7,35a	6,61a	5,57a	6,56a	6,52A
	T2 (4%)	5,53a	5,71a	5,73a	5,73a	5,68A
pH inicial	T1 (0%)	5,89a	5,87a	5,81a	5,75a	5,83A
	T2 (4%)	5,75a	5,72a	5,85a	5,79a	5,78A
pH final	T1 (0%)	4,94a	4,88a	4,92a	4,56b	4,82A
	T2 (4%)	4,21b	4,28ab	4,47ab	4,40ab	4,34B
Perdas gases (%MS ensilada)	T1 (0%)	5,17a	5,76a	6,33a	5,38a	5,66A
	T2 (4%)	3,84a	3,14a	6,69a	5,07a	4,68A
Perdas MS (%MS ensilada)	T1 (0%)	12,08a	14,31a	17,64a	18,26a	15,58A
	T2 (4%)	11,11a	7,51a	14,31a	12,04a	11,24B
Perdas Efluente (L/ton.MV ens.)	T1 (0%)	41,78b	69,74ab	82,22ab	104,00ab	74,43A
	T2 (4%)	53,96a	51,11a	40,89a	35,77a	45,43B
MS (%)	T1 (0%)	24,71a	27,75a	27,95a	28,48a	28,37A
	T2(4%)	29,57a	26,94a	28,95a	28,04a	27,22A
PB (%)	T1 (0%)	5,12a	4,37a	3,78a	4,95a	5,18A
	T2(4%)	4,75a	5,26a	5,41a	5,29a	4,56B
CZ (%)	T1 (0%)	10,97a	9,55b	9,62b	9,59b	9,93A
	T2(4%)	9,01b	9,69ab	9,18ab	9,11b	9,25B

Letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (a 5% de probabilidade)

Letras maiúsculas na mesma coluna para diferirem entre si cada parâmetro químico pelo teste Student (t) (5% probabilidade)

PT- Poder tampão

MS- Matéria seca

PB- Proteína bruta

Os parâmetros poder tampão (PT), pH inicial, perdas de gás e perdas de MS não apresentar diferenças significativas pelo teste estatístico ($p < 0,05$), porém tiveram valores menores com a inserção de glicerol. Houve interação nas variáveis PT, perdas de gás e perdas de MS para o uso de glicerina. Nas variáveis perdas de gases e MS, houve interação ($p < 0,05$) para uso de inoculante.

O pH final e as perdas de efluentes diferiram estatisticamente ($p < 0,05$), se encontrando mais próximo ao ideal. A adição de glicerol diminuiu o pH final da silagem, independentemente do inoculante utilizado (tabela 3).

4. DISCUSSÕES

As espécies *L. plantarum* e *L. brevis* utilizadas neste trabalho são comumente encontradas nos processos fermentativos para produção de silagem a partir de diferentes espécies forrageiras (Tabela 2). Essas espécies são frequentemente encontradas em silagens e foram identificadas e utilizadas como inoculantes em silagens de cana-de-açúcar (Ávila et al., 2009; Ávila et al., 2010) e outras forragens (Saarisalo et al., 2007; Li e Nishino, 2011a). As cepas apresentaram boa capacidade fermentativa em relação aos carboidratos testados.

Foram encontrados valores de BAL superiores a populações de fungos e leveduras. No tratamento com glicerina e inoculante a população de BAL foi superior a todas as outras (Figura 1). Segundo MUCK (1996), a predominância de bactérias lácticas homofermentativas, como *Lactobacillus plantarum*, resulta na produção de ácido láctico a partir de açúcares, sem formação de metabólitos secundários, reduzindo-se assim as perdas de MS na forma de gás.

Em contrapartida, as bactérias heteroláticas produtoras de ácidos acético e propiônico, além do ácido láctico, como *L. brevis* e *L. buchneri*, parecem promover certa inibição no crescimento de leveduras nas silagens de cana (Pedroso et al., 2007; Siqueira et al., 2007), embora exista grande variabilidade nos resultados de pesquisas disponíveis até o momento. Em decorrência do alto crescimento de leveduras em silagens de cana-de-açúcar (Ávila, 2007), as perdas de MS durante a ensilagem desta forrageira podem decorrer do intenso metabolismo desses microrganismos. A maior concentração de ácido acético pode estar associada com melhor preservação da silagem de cana-de-açúcar (Carvalho et al. 2014) e resultam em menor perda de MS e menor produção de etanol (Ávila et al., 2009).

Segundo Santos et al. (2006) a glicerina pode ser usada como ingrediente aditivo nas silagens de capim deve apresentar alto teor de matéria seca, assim não favorece o crescimento de leveduras e contribuir para baixar as perdas de efluentes.

Estudos indicam que o uso da glicerina melhora a estabilidade aeróbica da silagem, reduzindo os valores de pH e nas perdas durante o processo. Dias Júnior et al. (2010) realizaram estudo com adição de 10% de glicerina na matéria natural de cana-de-açúcar e observaram que a glicerina foi suficiente para aumentar as concentrações de matéria seca e densidade energética e apresentou redução na fibra em detergente neutro. Krempser et al.(2011), ao avaliarem silagem de milho com glicerina, relataram que houve redução de UFC (unidades formadoras de colônias) de vários microrganismos, e Oliveira et al. (2011) observaram que aumentou a estabilidade aeróbia na silagem de milho com glicerina.

A variável cinzas se diferiu estatisticamente pelo teste Tukey (5%), apresentando o maior valor no Trat.1, ou seja, sem adição de glicerina e inoculante, (Figura 2). O menor teor de cinza é indicativo de uma melhor conservação da forragem, pois, quando há fermentação incorreta, ocorrem perdas de matéria orgânico, aumentando a participação relativa da cinza também chamada de matéria mineral na MS (ASHBELL, 1995). O aumento do teor de cinzas das silagens provavelmente está relacionado à perda de matéria orgânica, decorrente dos processos de fermentação e oxidação (McDonald et al., 1991).

A variável MS apresentou o menor valor no tratamento 1, este era sem adição de glicerina e sem inoculante, ou seja, nos tratamentos com glicerina e inoculante apresenta valores superiores (Figura 2). Esta variação no conteúdo de MS das silagens pode ser explicada pela alta densidade ($1,2613 \text{ g.cm}^{-3}$) da glicerina, além de propriedades higroscópicas que permitem a ligação com as moléculas de água do material ensilado, aumentando a densidade da MS ensilada (IUPAC, 1997). As perdas de MS podem estar relacionadas à diminuição do conteúdo celular, principalmente de carboidratos solúveis, durante o processo fermentativo (SOEST, 1994).

Segundo Dias et al. (2014) nas perdas gasosas (% da MS), conforme foi adicionado glicerina bruta na ensilagem da cana-de-açúcar, as perdas por gases foram diminuídas, caracterizando a resposta do aditivo em reduzir perdas durante o processo de fermentação. Esse dado mostra que a glicerina bruta favorece o processo de fermentação reduzindo as perdas, sendo que esse efeito é maior conforme aumenta a idade do capim.

Os valores de proteína bruta diminuíram em relação a forragem fresca, mas ao adicionar

4% de glicerina houve um aumento no tratamento 5 em relação ao tratamento 1. Nos tratamentos com 4% de glicerina mais o inoculante, observamos aumento em todos os valores. O mesmo comportamento foi obtido por Gomes et al. (2013) que observaram uma redução de 37,56% no teor de PB da silagem de cana de açúcar com a adição de 15% de glicerina bruta em comparação a silagem controle.

As perdas por efluente se diferiu estatisticamente pelo teste de Tukey (5% probabilidade), e obteve valores menores nos tratamentos 6 a 8, ou seja, a adição de glicerina juntamente com inoculante diminuiu as perdas (Tabela 3). Alguns fatores também contribuem de forma indireta na produção de efluente nas silagens, como, por exemplo, a profundidade e a largura do silo (Bernardes et al. 2013). Segundo McDonald (1981) plantas ensiladas com elevados teor umidade produzem uma grande quantidade de efluentes, que acarream nutrientes altamente digestíveis, açúcares, ácidos orgânicos, diminuindo o valor nutritivo do alimento final.

Ao adicionar 4% de glicerina bruta houve uma diminuição nas perdas de efluentes, com valores entre 35,77 a 53,96. Igarassi (2002) observou produção de efluente de 9,04 e 51,8 L/t de silagens de capim Tanzânia produzidas em colheitas ocorridas no inverno (29% MS) e no verão (15,6% MS), respectivamente.

Os valores de pH final são inferiores aos valores de pH inicial, devido principalmente à atividade metabólica das BAL, o que é favorável à conservação da silagem (Tabela 3). A queda do pH em um processo de ensilagem é o que define a produção de microorganismos benéficos para o processo, como as bactérias do ácido lático (BAL) e ácido acético em proporções de no máximo 30%. As silagens de capins tropicais sem adição de inoculantes, geralmente apresentam valores de pH superiores a 5,0 como o observado por Amaral et al. (2008). Os valores de pH encontrados nessa pesquisa foi entre 4,21 e 4,94 (Tabela 3). A literatura, têm atribuído valores de pH entre 3,8 e 4,2 como adequados às silagens bem conservadas. (Tomich et al., 2004).

O poder tampão está diretamente ligado a variação do pH da massa ensilada, no tratamento com 4% de glicerina e diferentes inoculantes obteve-se menores valores de poder tamponante. Para Pereira et al. (2006), as silagens de capim colhido muito jovem tendem a sofrer fermentações indesejáveis, devido ao alto teor de umidade e poder tamponante, reduzido teor de MS e baixa população inicial de bactérias lácticas, resultando, segundo Igarasi (2002); Santos et al. (2006), em perdas de nutrientes na forma de gases e na forma de efluente, o que

são comuns em silagens desses capins.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos parâmetros químicos e microbiológicos analisados recomenda-se o uso de *Lactobacillus brevis* com adição de 4% de glicerol no capim Piatã, pois aumenta a população de BAL, diminuiu as perdas por efluentes, população de fungos filamentosos e leveduras que são microrganismos deletérios para silagem. Além disso, o uso de glicerol apresentou diferença estatística apenas nos parâmetros químicos de pH final, PB, cinzas, perdas de MS e efluentes.

Sugere-se que desenvolva pesquisas analisando a aceitação pelos animais e a palatabilidade desta silagem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, R. C.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. et al. Estabilidade aeróbia de silagens do capim-marandu submetidas a diferentes intensidades de compactação na ensilagem. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, p.977-983, 2008.

AOAC. (1990). Official methods of analysis of the AOAC, 15th ed. Methods 932.06, 925.09, 985.29, 923.03. Association of official analytical chemists. Arlington, VA, USA.

ASHBELL, G. 1995. Basic principles of preservation of forage, by-products and residues as silage or hay. Bet Dagan: Agricultural Research Organization, The Volcani Center. (n.1664-E). 58p.

Ávila CLS, Pinto JC, Figueiredo HCP, Schwan RF (2009) Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugarcane silage. *Grass Forage Sci* 6:384–394.

ÁVILA, C.L.S. Isolamento e uso de *Lactobacillus buchneri* na ensilagem de capim-mombaça e cana-de-açúcar. 2007. 175f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007

Ávila, C.L.S., Pinto, J.C., Figueiredo, H.C.P., Schwan, R.F., 2009. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar canesilage. *Grass Forage Sci*. 6, 384–394.

Ávila, C.L.S., Valeriano, A.R., Pinto, J.C., Figueiredo, H.C.P., Rezende, A.V., Schwan, R.F., 2010. Chemical and microbiological characteristics of sugar canesilages treated with microbial inoculants. *Braz. J. Anim. Sci.* 39, 25–32.

Bergamaschine AF, Passipiéri M, Veriano Filho WV, Isepon OJ, Corrêa LDA. Qualidade e valor nutritivo de silagens de capim-marandu (*B. brizantha* cv. Marandu) produzidas com aditivos ou forragem emurchecida. *Rev. Bras. Zootecnia*, 2006;35(4):1454-1462.

BERNARDES, T.; REIS, R.; SIQUEIRA, G. et al. Produção de efluente de silagens de capim-marandu contendo polpa cítrica peletizada. *Revista Ciencia Agraria*, v. 56, p. 326-330, 2013.

BRAVO-MARTINS, C.E.C.; CARNEIRO, H.; CASTRO-GÓMEZ, R.J. et al. Chemical and microbiological evaluation of ensiled sugarcane with different additives. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.499-504, 2006.

Carvalho BF, Ávila CLS, Pinto JC, Neri J, Schwan RF (2014) Microbiological and chemical profile of sugarcane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. *Anim Feed Sci Tech*. (In press).

Chao, S., Tomii, Y., Sasamoto, M., Fujimoto, J., Tsai, Y., Watanable, K., 2008. *Lactobacillus capillatus* sp. nov., a motile bacterium isolated from stinky brine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2555–2559.

DIAS, A.M.; ÍTAVO, L.C.V.; ÍTAVO, C.C.B.F. et al. Ureia e glicerina bruta como aditivos na ensilagem de cana-de-açúcar. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.66, p.1874-1882, 2014.

EMBRAPA GADO DE CORTE. Informativo piatã. [2014]. Available at: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/123641/1/Folder-PiataFinal-2014.pdf>. Accessed on: Mar. 15,2015.

GOMES, M.A.B. Glicerina na qualidade de silagens de cana-de-açúcar e de milho e na

produção de oócitos e de embriões in vitro de bovinos. 2013. 90f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

IGARASI, M. S. Controle de perdas na ensilagem de capim Tanzania (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzania) sob os efeitos do teor de matéria seca, do tamanho de partícula, da estação do ano e da presença do inoculante bacteriano. 2002. 132f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba.

IUPAC-The International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical terminology 1997. Disponível em: . Acesso em 15 mar. 2007.

JOBIM, C.; NUSSIO, L.; REIS R. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, p.101-119, 2007.

JOBIM, C.; NUSSIO, L.; REIS R. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p.101-119, 2007.

KREMPSER, P. M.; LOPES, R. P. X.; RIBEIRO, M. T.; LIMA, J. C. F.; OLIVEIRA, J. S. ; CARNEIRO, J. C. Microbiological evaluation of aerobic stability of corn silage with increasing levels of glycerin. In: ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L.G.; NETO, A. S. (eds.). FORAGE QUALITY AND CONSERVATION. 2., 2011, São Pedro. Proceedings...São Pedro: 2011.

KUNG JR., L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA, 2003. p.305-360.

Larsen, A.C., Gomes, M.M., Gomes, S.D., Zenatti, D.C., Torres, D.G.B. 2013. Anaerobic co-digestion of crude glycerin and starch industry effluent. *Eng. Agrícola*, Jaboticabal.

Li, Y., Nishino, N., 2011a. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1561–1570.

MCDONALD, P. et al. The biochemistry of silage. 3th ed. Chalcombe Publications, New York. 1991.

MCDONALD, P. The biochemistry of silage. New York: J. Wiley, 1981. 340 p.

MUCK, R. 1996. Inoculant of silage and its effects on silage quality. In: Informational conference with dairy and forage industries. Proceedings... US Dairy forage Research. Madison. USA. p. 43-52

NUSSIO, L. G.; PAZIANI, S. F.; NUSSIO, C. M. B. Ensilagem de capins tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife, PE. Anais... Recife: SBZ: Ed. dos Editores, 2002. 4f. 1 CD-ROM.

OLIVEIRA, J. S.; LOPES, R. P. X.; RIBEIRO, M. T.; LIMA, J. C. F.; KREMPSER, P. M.; CARNEIRO, J. C. 2011. Temperature evaluation on aerobic stability of corn silage with increasing levels of glycerin. In: ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G.; NETO, A. S. (eds.). FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. Proceedings... São Pedro: 2011.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; LOURES, D.R.S. et al. Efeito do tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos nas perdas e na qualidade de silagens de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, n.3, p.558-564, 2007.

PEREIRA, O.G.; GOBBI, K.F.; PEREIRA, D.H. et al. Conservação de forragens como opção

para o manejo de pastagens. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. Anais... João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2006. (CD-ROM).

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

REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. et al. Volumosos na produção de ruminantes. Valor alimenticios de forragens. 1.ed, Jaboticabal: Editora Funep, 2003, 264p.

ROTZ, C.A.; MUCK, R.E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) Forage quality, evaluation, and utilization. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.828-868.

Saarisalo, E., Skytta, E., Haikara, A., Jalava, T., Jaakkola, S., 2007. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *J. Appl.Microbiol.* 102, 327–336.

SANTOS, E.M.; ZANINE, A. M. Silagem de Gramineas Tropicais. *Colloquium Agrariae*, v. 2, p. 32-45, 2006. DOI: 10.5747/ca.2006.v02.n1.a21.

SILVEIRA, A. P. Valor nutritivo de forrageiras de inverno e produção de silagem pré-secada. 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de PósGraduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2015.

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. et al. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, n.6, p.2000-2009, 2007.

TOMICH, T.R.; GONÇALVES, L.C.; TOMICH, R.G.P. et al. Características químicas e digestibilidade in vitro de silagens de girassol. *Rev. Bras. Zootec.*, v.33, p.1672-1682, 2004.

VILELA, D. Aditivos para silagens de plantas de clima tropical. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. Anais... Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1998.

WEINBERG, Z. G.; MUCK, R. E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, Haren, v. 19, n. 3, p. 53-68, July 1996.