



Composição química, caracterização e quantificação da população de microrganismos em capim-elefante cv. Cameroon (*Pennisetum purpureum*, Schum.) e suas silagens¹

Odilon Gomes Pereira², Karina Dosualdo Rocha³, Celia Lucia de Lucas Fortes Ferreira⁴

¹ Parte da tese de Mestrado da segunda autora, financiada pelo CNPq.

² Departamento de Zootecnia/UFV, Viçosa, MG, CEP: 36571-000. Bolsista do CNPq.

³ Zootecnista, Viçosa, MG, CEP: 36571-000. Bolsista do CNPq.

⁴ Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFV, Viçosa, MG, CEP: 36571-000.

RESUMO - Avaliaram-se o pH, a relação nitrogênio amoniacal/nitrogênio total (N-NH₃), a composição química e a digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e as populações microbianas de silagens de capim-elefante produzidas ou não com inoculantes enzimo-bacterianos, em seis períodos de fermentação (1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias), utilizando-se silos laboratoriais. Foi usado um arranjo fatorial 6 x 3 (seis períodos de fermentação x três inoculantes), em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Avaliaram-se os seguintes inoculantes microbianos: controle (sem inoculante), Sil All C4 (Alltech do Brasil) e Bacto Silo C Tropical (Katec). Os teores de PB, FND e FDA, foram influenciados apenas pelo período de fermentação, enquanto para a DIVMS observou-se efeito da interação inoculante x período. Para o pH observou-se efeito de inoculante e de período, estimando-se reduções de 0,5769; 0,62327 e 0,80218 unidades/dia de fermentação para as silagens controle e tratadas com Sil All e Bacto Silo, respectivamente. Para o teor de N-NH₃, observou-se efeito da interação inoculante x período. A população de bactérias ácido láctico no capim antes da ensilagem foi de 10⁴ ufc/g de forragem fresca, atingindo valor máximo da ordem de 10⁸ ufc/g de silagem, para a silagem controle, aos 14 dias de fermentação, e para as silagens tratadas com inoculantes, aos 7 dias. As enterobactérias não foram detectadas a partir do terceiro dia, apresentando valor máximo de 10⁴, < 10 e 10³ ufc/g para as silagens controle, Sil All e Bacto Silo C Tropical, respectivamente.

Palavras-chave: bactérias ácido-láticas, enterobactérias, leveduras, mofos, nitrogênio amoniacal, pH

Chemical composition, characterization, and population of microorganisms on elephantgrass "Cameroon" (*Pennisetum purpureum*, Schum) and its silages

ABSTRACT - Values of pH, ammonia nitrogen/total nitrogen (NH₃-N), chemical composition, *in vitro* DM digestibility (IVDMD) and microbial populations of elephantgrass silages produced with enzymatic-bacterial inoculants, were evaluated in six fermentation periods (1, 3, 7, 14, 28, and 56 days), using laboratory silos. A 6 x 3 (six fermentation periods x three inoculants) factorial arrangement of treatments in a completely randomized design, with three replicates, was used. The following bacterial inoculants were evaluated: control (without inoculant), Sil All C4 (Alltech of Brazil) and Bacto Silo Tropical C (Katec). The CP, NDF and ADF contents were affected only by the fermentation period. The IVDMD, however, was affected by the inoculant x fermentation period interaction. The IVDMD concentration, however, was affected by the interaction between inoculant and fermentation period. There was a significant effect of inoculant and period on pH value, being observed reduction of 0.5769; 0.62327, and 0.80218 units/day of fermentation for the control silage, silage treated with Sil All, and Bacto Silo, respectively. It was observed inoculant x fermentation period interaction for NH₃-N. The lactic acid bacteria population in the grass before ensiling was 10⁴ cfu/gram of fresh forage, reaching maximum value of 10⁸ cfu/gram of fresh silage at 14 days of fermentation to the control silage, and at 7 days of fermentation to the silages treated with inoculant. The enterobacter were not detected after the third day of fermentation and the maximum values of 10⁴, <10, and 10³ cfu/gram were registred for the silage to control, Sil All, and Bacto Silo Tropical C silages, respectively.

Key Words: ammonia nitrogen, enterobacter, lactic acid bacteria, molds, pH, yeasts

Introdução

Entre as forrageiras tropicais, o capim-elefante tem se destacado como uma das espécies mais promissoras e de maior potencial para a ensilagem, em virtude do satisfatório

teor de carboidratos solúveis (Vilela, 1990), fácil cultivo, da boa aceitabilidade e do alto rendimento forrageiro (Tosi et al., 1995).

A ensilagem tem como principal objetivo maximizar a preservação original dos nutrientes encontrados na forra-

gem fresca, durante o armazenamento, com o mínimo de perdas de MS e energia. É necessário, portanto, que a respiração da planta e sua atividade proteolítica, bem como a atividade clostrídica e o crescimento de microrganismos aeróbios, sejam limitadas.

Além do manejo adequado, a planta ao ser colhida deve apresentar teor de umidade ideal para a ocorrência de compactação ótima da massa ensilada e manutenção dos nutrientes, bem como o teor de carboidratos solúveis deve ser suficiente para promover adequada fermentação láctica. Os substratos disponíveis para a fermentação são usados por microrganismos que utilizam rotas metabólicas diferenciadas, com a conseqüente produção de ácido láctico, principal produto da fermentação de bactérias lácticas, ou de outros produtos como etanol e CO₂, que são indesejáveis, tanto pela perda de energia no processo fermentativo da silagem quanto por ser um composto neutro para a flora ruminal (Van Soest, 1994). Portanto, um número adequado de bactérias lácticas é necessário para garantir boa produção de ácido láctico, promovendo queda mais rápida no pH e inibindo a atividade de microrganismos deletérios à silagem, como enterobactérias, bactérias clostrídicas e outros.

O estudo da flora epifítica ou flora original das plantas, segundo Pahlow (1989), tem revelado resultados variáveis quanto à composição e ao número de microrganismos, uma vez que estão sujeitos aos elementos do clima, os quais são influenciados pela localização geográfica onde os estudos são conduzidos. Desse modo, os elementos do clima e a composição das plantas irão interferir diretamente nos vários complexos bioquímicos e processos microbiológicos que transcorrem desde o momento da colheita da forragem até o fornecimento da silagem ao animal.

A utilização dos açúcares durante a fermentação ocorre por um processo competitivo entre as bactérias lácticas e vários outros grupos de microrganismos. Na fase inicial do processo de ensilagem, ocorre a proliferação de bactérias anaeróbias facultativas produtoras de ácido acético (enterobactérias) e de outras bactérias lácticas heterofermentativas. Estas bactérias produzem etanol, ácido acético, ácido láctico e CO₂, utilizando glicose, frutose, xilose e ribose como substratos. A produção desses ácidos, principalmente de ácido láctico, reduz o pH, e, quando este é inferior a 5, o número dessas bactérias decresce e as bactérias lácticas homofermentativas, ou seja, aquelas cujo produto principal é o ácido láctico dominam a fermentação (McAllister & Hristov, 2002).

Para se obter efetiva fermentação do material ensilado, têm-se adotado algumas estratégias visando à produção de altos níveis de ácido láctico e ao rápido abaixamento do pH (<4,2), durante a fermentação. Neste contexto, o uso de

aditivos, como os inoculantes bacterianos, destaca-se como alternativa disponível, pois, segundo Filya et al. (2000), são produtos seguros, não corrosivos e não poluentes, fáceis de serem manuseados e, portanto, considerados produtos naturais.

A utilização de culturas microbianas que controlam a fermentação por vias metabólicas de degradação de substratos que sejam energeticamente mais eficientes é considerada fundamental (Daeschel et al., 1987), pois inoculantes microbianos desenvolvidos a partir da própria planta a ser ensilada tem revelado melhor padrão fermentativo e maior recuperação da MS ensilada. Portanto, pesquisas de identificação da flora epifítica da forrageira são essenciais antes da recomendação do uso de inoculantes microbianos (Pahlow, 1989; Pitt, 1990).

O uso de inoculantes enzimo-bacterianos vem sendo difundido em todo o mundo, como alternativa capaz de favorecer a fermentação. No entanto, em condições tropicais, os estudos que relacionam estes inoculantes à fermentação e, ou, ao desempenho de animais ainda são escassos, indicando a necessidade de pesquisas envolvendo essas características.

Conduziu-se este trabalho objetivando-se quantificar e caracterizar as populações microbianas e avaliar a composição química, o pH, a relação nitrogênio amoniacal/nitrogênio total e a digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) de silagens de capim-elefante produzidas ou não com inoculantes enzimo-bacterianos.

Material e Métodos

O capim-elefante cv. Cameroon foi obtido a partir de uma capineira já estabelecida em uma área do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG. A cidade de Viçosa está situada a 20°45' de latitude sul, 42°51' de longitude oeste e 657 m de altitude, apresentando precipitação média anual de 1.341 mm, dos quais cerca de 86% ocorrem nos meses de outubro a março. A temperatura média das máximas é de 26,1°C e a média das mínimas, de 14,0°C. O clima da região é classificado como "Cwa", segundo classificação proposta por Köepen (1948).

Utilizou-se um arranjo fatorial 6 x 3, seis períodos de fermentação (1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias) e três inoculantes (controle, Sil All C4 e Bacto Silo C Tropical), em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, para avaliação dos teores de PB, da relação nitrogênio amoniacal/nitrogênio total (N-NH₃) e do pH. Para avaliação dos constituintes fibrosos e da DIVMS, consideraram-se apenas quatro períodos de fermentação (1, 14, 28 e 56 dias).

O capim foi cortado quando apresentava cerca de 100 dias de rebrotação e altura de 2,5 m, com auxílio de facão, rente ao solo, e, em seguida, picado em ensiladeira estacionária, previamente regulada para o tamanho de partícula igual a 2,0 cm. Os inoculantes comerciais avaliados foram: Sil-All C4, da Alltech do Brasil, contendo os seguintes níveis de garantia: *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus salivarius* (10 bilhões UFC/g), enzimas celulase e hemicelulase a 5%, e Bacto Silo C Tropical, da Katec Agrotécnica LTDA, com a seguinte composição: complexo bacteriano em alta concentração e complexo enzimático amilolítico. Os inoculantes foram adicionados ao material picado, com o auxílio de um pulverizador, com capacidade para 2 L, respeitando-se as recomendações dos fabricantes.

O material foi acondicionado em silos de PVC (40 cm de altura e 10 cm de diâmetro), dotados de válvula de Bünsen, com capacidade para aproximadamente 2 kg de forragem, com base na matéria natural. Em seguida, os silos foram fechados, pesados e armazenados em área coberta, em temperatura ambiente, até o momento de abertura, compreendido pelos períodos de fermentação de 1; 3; 7; 14; 28 e 56 dias.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Forragicultura do Departamento de Zootecnia da UFV, no material antes da ensilagem e nas silagens correspondentes aos diferentes períodos de fermentação, tomando-se uma amostra composta das três repetições de campo. A contagem microbiana foi efetuada em duplicata e os dados obtidos foram analisados conforme os procedimentos adotados por González & Rodriguez (2003). Aos 50 g de amostra foram adicionados 450 mL de água destilada, procedendo-se, em seguida, à mistura em liquidificador industrial por cerca de 1 minuto. Da solução obtida, pipetou-se 1 mL ou 0,1 mL, com diluições que variaram de 10^{-1} a 10^{-9} , usando-se garrafas para água de diluição contendo 99,9 mL de solução tampão fosfato, com pH de 7,2. O plaqueamento foi feito em duplicata para cada diluição e meio de cultura.

As possíveis alterações microbianas e as populações mais influentes no processo de fermentação das silagens avaliadas foram determinadas por meio de técnicas de culturas seletivas, consistindo nas seguintes denominações:

Ágar Nutriente (DIFCO, Detroit), para contagem total de microrganismos, após incubação por 48 horas, à temperatura de 35°C;

Ágar Rogosa SL (DIFCO, Detroit), para contagem de lactobacilos após incubação por 48 horas, em estufa,

à temperatura de 37°C, sendo o pH do meio da cultura igual a 5,4;

Ágar BDA, para contagem de leveduras e mofos, após incubação por 5-7 dias, à temperatura ambiente, sendo o pH do meio de cultura igual a 4,2; e

Ágar Violeta Red Bile (DIFCO, Detroit), para contagem de enterobactérias, após incubação por 24 horas, à temperatura de 35°C;

Foram consideradas passíveis de contagem aquelas placas que apresentaram entre 30 e 300 ufc por placa de Petri. Os resultados foram obtidos por meio da média das duas placas, na diluição selecionada.

Por ocasião da abertura dos silos, efetuou-se nova pesagem destes e foram coletadas amostras de material de cada silo para determinações de pH e N-NH₃ (Bolsen et al., 1992). Para o pH foram coletadas sub-amostras de 25 g de silagem, às quais foram adicionados 100 mL de água destilada, permanecendo-se em repouso por duas horas, efetuando-se, em seguida, a leitura do pH. Em outra sub-amostra de 25 g de silagem, adicionaram-se 200 mL de uma solução de H₂SO₄ 0,2N, permanecendo em geladeira por 48 horas, fazendo-se em seguida, a filtragem em papel-filtro do tipo "Whatman 54". Esse filtrado permaneceu em geladeira até as determinações de N-NH₃.

Concomitantemente, as amostras originais e suas respectivas silagens foram submetidas à pré-secagem a 65°C, por 72 horas, em estufa de ventilação forçada. Em seguida, foram trituradas em moinho estacionário tipo "Thomas-Willey", utilizando-se peneira com malha de 1 mm, e acondicionadas em frascos de vidro com tampas de plástico para análises posteriores.

Os materiais originais e as silagens foram avaliados quanto aos teores de PB, carboidratos solúveis em água (CHOSol), FDN e FDA e à DIVMS, segundo recomendações de Silva & Queiroz (2002).

Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância e regressão, utilizando-se o programa SAEG, versão 8.0 (UFV, 2000). Para os fatores qualitativos, aplicou-se o teste Tukey, a 5% de probabilidade, na comparação das médias.

A escolha das equações de regressão foi feita com base no coeficiente de determinação e na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste t. Para avaliação do pH, em função do período de fermentação, procedeu-se ao ajuste dos dados ao modelo não-linear: $Y_t = A + Bx e^{-ct}$, proposto por Hristov & McAllister (2002), em que: A refere-se ao valor final de pH; B, à queda total em t tendendo ao infinito; e C, à taxa de declínio da fração B.

Resultados e Discussão

O capim-elefante na ensilagem apresentou valores médios de 25,8; 5,2; 7,4; 77,7 e 54,3% para MS, CHOsol, PB, FDN e FDA, respectivamente. O teor médio de MS do capim-elefante nesta pesquisa assemelhou-se àquele preconizado (25%) por McDonald et al. (1991), como condição necessária para que as perdas por efluentes no silo sejam minimizadas e, portanto, ocorra a manutenção dos nutrientes de suas silagens. O teor médio de CHOsol (5,2%) encontra-se abaixo do valor mínimo (8%) estabelecido por esses autores para adequada fermentação. Contudo, é importante destacar que existe efeito da interação dos teores de CHOsol e MS sobre o padrão de fermentação da forragem ensilada.

Observou-se que o teor de PB das silagens foi influenciado apenas pelo período de fermentação. No entanto, nenhuma equação de regressão ajustou-se aos dados, registrando-se valor médio de 6,3%. De certa forma, esse resultado já era esperado, uma vez que não existem expectativas de que os teores de proteína sejam alterados ao longo do período de fermentação. Contudo, os resultados encontrados na literatura não são consistentes. Silva (2001) não verificou variação no teor de PB de silagens de milho e de sorgo não tratadas com inoculantes, porém observou efeitos linear e quadrático, de período, sobre o teor de PB das silagens tratadas com os inoculantes Silobac e Maize-All, respectivamente.

Os teores de FDN e FDA também foram influenciados apenas pelo período de fermentação; os dados de FDN ajustaram-se ao modelo quadrático: $\hat{y} = 78,2703 - 0,153664^{**}P + 0,0017132^{**}P^2$ ($R^2 = 78,52$), estimando-se valor mínimo de 74,82% na MS, aos 44,84 dias de fermentação, e os de FDA, ao modelo linear $\hat{y} = 53,797 - 0,0391723^{*}P$ ($r^2 = 74,82$).

Meeske et al. (1999) também não encontraram diferenças entre os teores de FDN de silagens de *Digitaria eriantha*, tratadas ou não com inoculantes microbianos. No entanto, a redução da fração fibrosa nessas silagens pode ser indicativo de hidrólise ácida da hemicelulose, que, segundo McDonald et al. (1991), é atribuída à ação de enzimas da planta e de enzimas dos próprios microrganismos e à adição de enzimas por meio do inoculante microbiano.

A ausência de efeito de inoculantes contendo enzimas fibrolíticas sobre a fração fibrosa das silagens pode ser atribuída a vários fatores. Se um dos objetivos das enzimas for liberar substratos fermentescíveis para as bactérias ácido-láticas, elas devem ser ativas na fase inicial do processo de ensilagem, a um pH alto (5,5-6,4) e a temperaturas menores que ocorrerão posteriormente. Estas condições são comple-

tamente diferentes daquelas requeridas pela maioria das enzimas celulasas para ótima atividade (pH de 4,5 e temperatura de 50°C) (Kung Jr. et al., 2003). Área de superfície, sítios de ligação, teor de umidade e proteases das plantas podem também inibir a atividade enzimática. A redução significativa da fração fibrosa da forragem a glicose por um aditivo enzimático requer ação sinérgica entre as enzimas do complexo enzimático. A falta ou a menor concentração de uma ou mais enzimas no complexo pode explicar a pobre efetividade de algumas combinações de enzimas na modificação da composição ou da fermentação da silagem (Kung Jr. et al., 2003).

Observou-se efeito ($P < 0,05$) da interação inoculante \times período sobre a DIVMS (Tabela 1). No último dia de fermentação, o menor valor ($P < 0,05$) foi apresentado pela silagem produzida com o inoculante Bacto Silo, que, por sua vez, não diferiu ($P > 0,05$) da controle.

Constatou-se efeito quadrático ($P < 0,05$) de período de fermentação sobre a DIVMS da silagem não tratada, estimando-se valor máximo de 52,99%, aos 33,99 dias de fermentação, segundo a equação $\hat{y} = 46,1828 + 0,400657^{*}P - 0,0058963^{**}P^2$ ($R^2 = 91,95$). Para as silagens inoculadas, não se detectou efeito de período, registrando-se valores médios de 51,7 e 48,7%, para as silagens tratadas com os inoculantes Sil All e Bacto Silo C Tropical, respectivamente.

Observou-se efeito de inoculante e de período para o pH (Tabela 2), com o menor valor ($P < 0,05$) para a silagem tratada com o inoculante Sil All, que não diferiu da silagem controle. No entanto, as três silagens apresentaram valores de pH que permitem classificá-las de muito boa qualidade fermentativa. Segundo Muck & Kung Jr. (1997), os inoculantes obtiveram êxito em silagens de gramíneas e leguminosas de clima temperado, apresentando redução de pH em 59 a 64% dos experimentos avaliados.

Na Figura 1, notam-se taxas de decréscimos de 0,5796; 0,62327 e 0,80218 unidades por dia de fermentação no pH das silagens controle e daquelas produzidas com os inoculantes Sil All e Bacto Silo, respectivamente. A partir do terceiro dia, as silagens apresentaram valores médios de pH em torno de 4,2, indicando boa fermentação. Bernardes et al. (2005), em ensaio com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, observaram estabilização do pH a partir do quarto dia de ensilagem, em todos os tratamentos, que se estendeu até o último dia de avaliação (56 dias).

Hristov & McAllister (2002) registraram taxas de declínio no pH de silagens de cevada não emurhecida, variando de 0,488 (inoculante A) a 0,525 unidades por hora (inoculante B). Meeske et al. (1999) também verificaram rápida queda no pH e valor mais baixo em silagem de *Digitaria eriantha*

Tabela 1 - Médias de DIVMS de silagens de capim-elefante, em função de períodos de fermentação e inoculantes

Table 1 - Mean IVDMD of elephantgrass silages as a function of fermentation periods and microbial inoculants

Período (dias) Period (days)	Inoculante Microbial inoculant		
	Controle Control	Sill All	Bacto Silo
1	46,2b	51,0a	50,8a
14	51,7ab	52,0a	47,8b
28	52,0a	52,2a	48,9a
56	50,8ab	51,5a	47,4b

Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, não diferem ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

Means followed by the same letters within a row do not differ ($P < 0.05$) by Tukey test.

Tabela 2 - Médias de pH das silagens de capim-elefante para os diferentes inoculantes microbianos

Table 2 - Average pH of elephantgrass silages with different microbial inoculant

Item	Inoculante Microbial inoculant		
	Controle Control	Sill All	Bacto Silo
pH	3,96ab	3,94b	4,02a

Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, não diferem ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

Means followed by the same letters within a row do not differ ($P < 0.05$) by Tukey test.

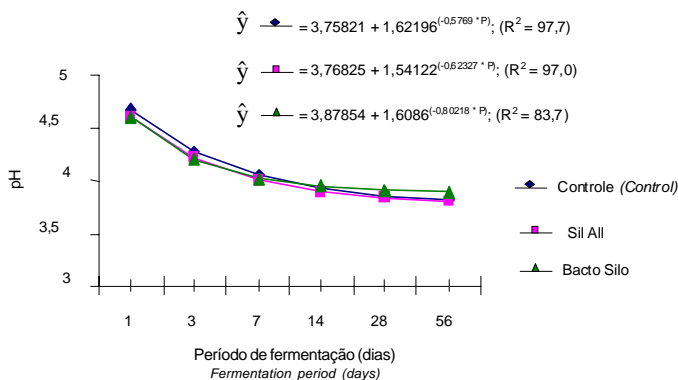


Figura 1 - Estimativa do pH, em função de períodos de fermentação(P), para as silagens de capim-elefante produzidas com diferentes inoculantes.

Figure 1 - Estimate of pH of elephantgrass silage produced with different bacterial inoculants as a function of fermentation periods (P).

inoculada com Sil-All. Rápido decréscimo do pH e seu menor valor final podem auxiliar na diminuição da população de microrganismos deletérios à silagem, os quais produzem grande quantidade de ácidos acético e butírico.

Houve efeito ($P < 0,05$) da interação inoculante × período sobre o teor de $N-NH_3$ (Tabela 3). Constata-se

Tabela 3 - Teores médios de $N-NH_3$ de silagens de capim-elefante, inoculadas ou não, nos diferentes períodos de fermentaçãoTable 3 - Average concentration of NH_3-N in elephantgrass silages as a function of fermentation periods and microbial inoculants

Período (dias) Period (days)	Inoculante Microbial inoculant		
	Controle Control	Sill All	Bacto Silo
1	4,15a	3,40a	4,29a
3	3,19a	3,98a	3,93a
7	4,77a	4,02a	4,25a
14	8,33b	5,38a	4,42a
28	7,71a	7,42a	6,42a
56	7,02a	7,92a	6,58a

Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, não diferem ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

Means followed by the same letters within a row do not differ ($P < 0.05$) by Tukey test.

que, somente aos 14 dias de fermentação, ocorreram diferenças ($P < 0,05$) entre as silagens, registrando-se maior valor para a silagem controle. Observou-se efeito quadrático ($P > 0,05$) de períodos de fermentação sobre o teor de $N-NH_3$ da silagem controle e daquela tratada com Sil All, cujos dados se ajustaram, respectivamente, às equações: $\hat{y} = 3,27317 + 0,3104 * P - 0,00438394 * P^2$ ($R^2 = 79,00$) e $\hat{y} = 3,10257 + 0,204312 * P - 0,00209833 * P^2$ ($R^2 = 98,08$). Todavia, para a silagem tratada com Bacto Silo, os valores de $N-NH_3$ não se ajustaram a nenhuma equação, registrando-se média de 4,98%. Com base nos valores de $N-NH_3$ registrados neste estudo, infere-se que todas as silagens foram bem preservadas.

Considerando-se os valores das características fermentativas avaliadas (pH e $N-NH_3$), pode-se afirmar que os inoculantes usados não foram efetivos em melhorar o padrão de fermentação das silagens. Segundo Kung et al. (2003), entre as prováveis explicações para falhas no uso de inoculantes à base de bactérias ácido láctico, destacam-se: intensa competição da flora epifítica, baixa concentração de açúcar fermentescível, excesso de oxigênio, baixa atividade de água, falta de especificidade da cultura e, ou, problemas com a aplicação.

A população de enterobactérias atingiu valor máximo, no primeiro dia de fermentação para a silagem controle e aquela tratada com Bacto Silo, não sendo mais detectada do 7º ao 28º dia de fermentação (Tabela 4). Todavia, aos 56 dias de fermentação, a população destes microrganismos foi detectada novamente, em todas as silagens. Bernardes et al. (2005), avaliando silagens de *Brachiaria brizantha* na presença de polpa cítrica peletizada, também constatarem maior população de enterobactérias no primeiro dia de fermentação, para todos os tratamentos. No entanto,

Tabela 4 - População de microrganismos (log ufc/g forragem fresca) em capim-elefante antes e após a ensilagem, para os diferentes períodos de fermentação e inoculantes bacterianos

Table 4 - Microbial population (log cfu/g fresh forage) of elephantgrass prior and after ensiling as a function of fermentation periods and microbial inoculants

Inoculante <i>Inoculant</i>	Período de fermentação <i>Fermentation period</i>						
	0 ¹	1	3	7	14	28	56
<i>Enterobactérias (Enterobacter)</i>							
Controle (<i>Control</i>)	4,69	6,11	3,69	ND	ND	ND	2,44
Sil All		2,07	ND	ND	ND	ND	1,53
Bacto Silo		5,2	1,08	ND	ND	ND	2,86
<i>Bactéria ácido láctico (Lactic acid bacteria)</i>							
Controle (<i>Control</i>)	4,92	6,04	5,91	6,88	8,34	7,38	7,17
Sil All		6,53	6,36	8,63	8,67	7,46	7,25
Bacto Silo		6,78	7,66	8,50	8,67	7,88	7,34
<i>Mofo e levedura (Molds and yeast)</i>							
Controle (<i>Control</i>)	3,74	3,91	2,82	2,77	3,14	2,76	3,25
Sil All		2,63	2,38	1,41	2,72	2,43	2,83
Bacto Silo		3,49	1,47	ND	2,94	2,43	3,70
<i>Contagem total (Total count)</i>							
Controle (<i>Control</i>)	7,32	6,93	5,41	4,37	3,32	4,38	3,36
Sil All		6,46	5,72	5,61	5,49	7,39	4,64
Bacto Silo		7,41	5,53	5,04	4,55	6,82	4,54

¹ Planta antes da ensilagem (*elephantgrass before ensiling*).
ND = não detectável (*not detected*).

esses autores não detectaram a presença desses microrganismos a partir do quarto dia de fermentação.

Segundo Luis & Ramirez (1988), normalmente as enterobactérias multiplicam-se até aproximadamente o 7º dia de fermentação, quando são substituídas pelos grupos lácticos. No entanto, esses microrganismos apresentam grande poder de sobrevivência e podem ser encontrados até os 30 dias de conservação, por terem habilidade de crescimento sob condições de anaerobiose e protegerem-se quando se encontram sob condições adversas, tal qual acontece sob valor de pH muito baixo. Bolsen et al. (1992) observaram populações de enterobactérias de 10⁴ e 10² ufc/g de silagem de milho, após 42 e 120 dias de fermentação, respectivamente. No entanto, pesquisas com silagens de diferentes plantas forrageiras têm demonstrado que esses grupos microbianos sofrem elevadas reduções até o 10º dia de ensilagem (Meeske et al., 1999), podendo ou não desaparecer por completo até o final do período de conservação.

A população de bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), na planta de capim-elefante (10⁴ ufc/g forragem fresca), situa-se abaixo daquela preconizada por Muck (1991), de 10⁵ ufc/g de forragem fresca, como mínimo necessário para que perdas significativas deixem de ocorrer

ao longo da fermentação, em decorrência da fermentação láctica das silagens. Meeske et al. (1999) encontraram população de lactobacilos da ordem de 10¹ ufc/g de forragem fresca na planta de *Digitaria eriantha*, no tratamento controle, e Cai et al. (1998), analisando a microflora epifítica de capim-guiné (*Panicum maximum* Jacq), de 10³ ufc/g de forragem fresca. Nota-se que a população de BAL mostrou-se dominante em relação aos outros microrganismos, em todas as silagens, atingindo valor de 10⁸ ufc/g, no 14º dia de fermentação (Tabela 4).

A população inicial de leveduras e mofos encontra-se abaixo (10³ ufc/g de forragem fresca) daquela encontrada para a população de leveduras por Meeske et al. (1999), na planta de *Digitaria eriantha* (10⁶ ufc/g de forragem fresca), e Silva (2001), em plantas de milho e de sorgo (10⁷ ufc/g de forragem fresca). No entanto, Cai et al. (1998) observaram população de leveduras e mofos da ordem de 10³ ufc/g de forragem fresca para o capim-guiné. Todavia, ao analisarem uma silagem após 44 dias de fermentação, Meeske et al. (1999) encontraram populações da ordem de 10³ e 10² ufc/g silagem, para as populações de levedura e mofo, respectivamente, valores semelhantes aos encontrados neste estudo.

Avaliando-se os resultados dos testes fisiológicos de microrganismos isolados da planta de capim-elefante (Tabela 5), constata-se que as características de forma, arranjo, teste de gram, catalase e hidrólise da arginina caracterizam-nos como espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus*.

Quanto ao padrão fermentativo das estirpes isoladas e ao padrão de espécies do gênero *Lactobacillus* encontradas no Manual de Bergey (Sneath et al., 1986),

todas as estirpes isoladas fermentaram os mesmos carboidratos (Tabela 6).

Ao analisar as características fisiológicas e o padrão fermentativo da estirpe isolada, pode-se indicar que esta se assemelha às características apresentadas pelas espécies *Lactobacillus casei* ssp *casei* e *Lactobacillus casei* ssp *pseudoplantarum*. No entanto, para que a espécie seja identificada, faz-se necessária a análise genotípica da estirpe isolada.

Tabela 5 - Caracterização de estirpes isoladas na planta de capim-elefante de acordo com parâmetros fisiológicos

Table 5 - Characterization of isolated strains on elephantgrass using physiological parameters

Teste Test	Estirpe isolada Isolated strain						
	1	2	3	4	5	6	7
Forma Shape	Bastão Rod	Bastão Rod	Bastão Rod	Bastão Rod	Bastão Rod	Bastão Rod	Bastão Rod
Arranjo Arrangement	2/fileira 2/row	2/fileira 2/row	2/fileira 2/row	2/fileira 2/row	2/fileira 2/row	2/fileira 2/row	2/fileira 2/row
Gram	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-
Arginina (Arginine)	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento em diferentes pH Growth in different pH							
9,2	-	-	-	-	-	-	-
9,6	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento em NaCl Growth in NaCl							
NaCl 3%	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 4%	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 5%	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 6.5%	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento em diferentes temperaturas (°C) Growth in different temperatures (°C)							
15°C	+	+	+	+	+	+	+
21°C	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento em aerobiose/anaerobiose Growth in aerobic/anaerobic conditions							
Aerobiose (Aerobic)	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobiose (Anaerobic)	+	+	+	+	+	+	+

+ Positivo (positive); - Negativo (negative).

Tabela 6 - Padrão fermentativo das estirpes isoladas do capim-elefante e de espécies do gênero *Lactobacillus*

Table 6 - Fermentation standard of isolated strains from elephantgrass and from species of *Lactobacillus* genus

	Teste ¹ (Test)	<i>L. agilis</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. bavaricus</i>	<i>L. casei</i> ssp <i>casei</i>	<i>L. casei</i> ssp <i>pseudopiantarum</i>	<i>L. casei</i> ssp <i>rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> ssp <i>tolerans</i>	<i>L. coryniformis</i> ssp <i>coryniformis</i>	<i>L. coryniformis</i> ssp <i>torquens</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. fromohiochii</i>	<i>L. maltaromicus</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sake</i>
Amygdalin	+	+	n	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	D	+	+
Arabinose	-	-	D	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	+	D	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	D	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	-	D	-	+	N	N	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gluconate	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	N	-	+	+
Lactose	+	+	-	+	D	+	+	+	D	+	D	-	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	D	+	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	-	+	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	+	-	D	-
Melibiose	+	+	-	+	-	-	-	-	D	-	-	-	+	+	+	+
Raffinose	-	+	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	+	+	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	-	D	-	+	D	+	D	+	+
Sorbitol	+	D	-	-	+	+	+	-	D	-	-	-	+	-	+	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	D	+	D	+	+
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-

¹ Estirpe isolada da planta de capim-elefante (Isolated strain from elephantgrass plant).

+ 90% ou mais das estirpes são positivas (90% or more of the strains are positive).

- 90% ou mais das estirpes são negativas (90% or more of the strains are negative).

D – 11-89% das estirpes são positivas (11-89% of the strains are positive).

N – reação não determinada (Not detected).

Conclusões

As silagens produzidas podem ser consideradas de boa qualidade fermentativa, considerando-se os baixos valores de pH e N-NH₃, não havendo a necessidade de inclusão de aditivos enzimo-bacterianos, uma vez que estes não alteram também a composição química e a digestibilidade das silagens.

As populações microbianas quantificadas nas silagens de capim-elefante são adequadas para a manutenção de uma boa fermentação no silo.

Com base nas características fisiológicas e no padrão fermentativo da estirpe isolada em plantas de capim-elefante antes da ensilagem, esta se assemelha às características apresentadas pelas espécies *Lactobacillus casei* ssp *casei* e *Lactobacillus casei* ssp *pseudoplantarum*

Literatura Citada

- BERNARDES, T.F.; REIS, R.A.; MOREIRA, A.L. Fermentative and microbial profile of marandugrass ensiled with citrus pulp pellets. *Scientia Agricola*, v.62, p.214-220, 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.
- CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M. et al. Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp from forage crops on silage fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, p.2982-2987, 1998.
- DAESCHEL, M.A.; ANDERSON, R.E.; FLEMING, H.P. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiology Reviews*, v.46, n.3, p.357-367, 1987.
- DIFCO MANUAL. 10.ed. Michigan: DIFCO Laboratories, 1984. 1166p.
- FILYA, I.; ASHBELL, G.; HEN, Y. et al. The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of whole crop wheat silage. *Animal Feed Science and Technology*, v.88, p.39-46, 2000.
- GONZÁLEZ, G.; RODRÍGUEZ, A.A. Effect of storage method on fermentation characteristics, aerobic stability and forage intake of tropical grasses ensiled in round bales. *Journal of Dairy Science*, v.86, n.3, p.926-933, 2003.
- HRISTOV, A.N.; McALLISTER, T.A. Effect of inoculants on whole-crop barley silage fermentation and dry matter disappearance in situ. *Journal of Animal Science*, v.80, p.510-516, 2002.
- KÖEPPEN, W. *Climatologia*. Buenos Aires: Panamericana, 1948. 478p.
- 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*. Madison: ASA-CSSA-SSSA, 2003. v.42, p.305-360.
- LUIS, L.; RAMIREZ, M. Evolución de la flora microbiana en ensilaje de king grass. *Pastos y Forrajes*, v.11, p.249-253, 1988.
- McALLISTER, T.A.; HRISTOV, A.N. [2002]. **The fundamentals of making good quality silage**. Disponível em: www.afns.ualberta.ca/hosted/wcd2000...s/chapter32.htm Acesso em: 1/9/2002.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcombe Publication, 1991. 340p.
- MEESKE, R.; BASSON, H.M.; CRUYWAGEN, C.W. The effect of a lactic acid bacterial inoculant with enzymes on the fermentation dynamics, intake and digestibility of *Digitaria eriantha* silage. *Animal Feed Science and Technology*, v.81, n.3/4, p.237-248, 1999.
- MUCK, R.E. Silage fermentation. In: **Mixed cultures in biotechnology**. New York: McGraw Hill Inc., 1991. p.171-204.
- MUCK, R.E.; KUNG JR., L. Effects of silage additives on ensiling. In: **SILAGE FIELD TO FEEDBUNK, 1997, Pennsylvania. Proceedings...** New York: NRAES, 1997. n.99, p.187-199.
- PAHLOW, G. Ecological studies of epiphytic lactic acid bacteria (Lab) on whole plant maize and in inoculated silage. In: **FOOD FOR THOUGHT, 2., 1989., Johnston. Proceedings...** Johnston: Pioneer Hi-Bred International, 1989.
- PITT, R.E. The probability of inoculant effectiveness in alfalfa silages. *Transactions of the ASAE*, v.33, n.6, p.1771-1778, 1990.
- SILVA, A.V. **Populações microbianas em plantas de milho e sorgo, produtos da fermentação e desempenho de bovinos de corte, suplementados com suas silagens, tratadas com inoculantes microbianos**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 122p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2001
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos** 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.
- SNEATH, P.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p.1-35.
- TOSI, H.; RODRIGUES, L.R.A.; JOBIM, C.C. et al. Ensiling do capim-elefante cv. Mott sob diferentes tratamentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v.24, n.6, p.909-916, 1995.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **SAEG – Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 8.0. Viçosa, MG: 2000. 150p. (Manual do usuário).
- Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 1.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 374p.
- VILELA, D. Utilização do capim-elefante na forma de forragem conservada. In: **SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 1990, Coronel Pacheco. Anais...** Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1990. p.89-131.

Recebido: 25/1/2006

Aprovado: 31/5/2007