



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**



MICHELINE THAIS DOS SANTOS

Lactobacillus buchneri EM SILAGEM DA FOLHA DE MANDIOCA

RIO LARGO

2018

MICHELINE THAIS DOS SANTOS

***Lactobacillus buchneri* EM SILAGEM DA FOLHA DE MANDIOCA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tania Marta Carvalho dos Santos

RIO LARGO

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Bibliotecário: Erisson Rodrigues de Santana

S2371 Santos, Micheline Thais dos

Lactobacillus buchneri em silagem da folha de mandioca. Rio
Largo - AL – 2018.

61 f.; il; 33 cm

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Alagoas,
Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2018.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Tania Marta Carvalho dos Santos.

1. Aditivo microbiano. 2. Bactérias acidoláticas. 3. Fermentação. 4.
Ruminante. I. Título.

CDU: 636.2

TERMO DE APROVAÇÃO

MICHELINE THAIS DOS SANTOS

LACTOBACILLUS BUCHNERI EM SILAGEM DA FOLHA DE MANDIOCA.

Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovado em 16/03/2018



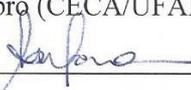
Prof.ª. Dr.ª. Tania Marta Carvalho dos Santos

Orientadora (CECA/UFAL)



Prof. Dr. Cícero Cerqueira Cavalcanti NETO

Membro (CECA/UFAL)



Prof.ª. Dr.ª. Sandra Roseli Valério Lana

Membro (CECA/UFAL)

Rio Largo – AL

2018

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu grande Companheiro de todos os dias, por me dar forças e, em meio as minhas simples orações não me fazer desistir e enfrentar todas as dificuldades vividas, transformando-as com muito esforço, em alegrias e realizações.

À professora Tania Marta Carvalho dos Santos pelo convívio, pelo apoio, compreensão e pela amizade durante todos esses anos de vida acadêmica que não se limitaram apenas em uma relação de orientador-aluno.

À minha família, principalmente minha mãe, por não desacreditar da minha capacidade de ir além do que já sou e vivo. Por todo apoio que proporcionou-me para continuar e não desistir de seguir meus objetivos e propósitos dando-me, principalmente, o livre arbítrio de minhas escolhas profissional e acadêmica.

Aos meus amigos-irmãos que se faz presente em momentos de alegrias, tristezas, perturbações e de dúvidas. Aos que a vida me apresentou antes de ingressar na vida acadêmica e aos que ganhei na universidade e que estão sempre comigo independentemente da distância e situação, para apoiar, puxar a orelha e confraternizar momentos únicos: Dayllis Menezes, Erica Guedes, Éwerton Celestino, Luis Carlos, Elizabeth Amaral, Renata Alves, Rildete Oliveira, Jockeliny Mayara, Karol Padilha e Sybelle Mesquita, à eles toda minha gratidão pela amizade e paciência que têm comigo.

A todos da turma do mestrado por vivermos juntos todo esse período de provação como uma família em momentos divertidos e de dificuldade, noites e dias sem dormir em busca de um só objetivo: Socorro Moraes (nossa Help), Luis Carlos, Elizabeth Amaral, Lucas Gonzaga, Breno Melo, Rodrigo Fonseca, Jefferson Santos, Ellyson Rocha, as gêmeas Nahra e Namíbia e Maysa Torres.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia Agrícola, que me acolheu e ensinou a superar as dificuldades do trabalho sempre com criatividade para produzir e bom humor para vencer e enfrentar a lida de todos os dias. Por ensinar a crescer como pessoa e profissionalmente através do convívio diário com pessoas boas e outras nem tanto, mantendo o ambiente profissional sempre em harmonia.

Aos professores que sempre incentivaram direta e indiretamente durante todo meu período de formação, tanto na graduação como na pós-graduação do curso de Zootecnia da UFAL, serão sempre lembrados com carinho e como fontes de sabedoria para minha vida profissional.

“Entenda seus medos, mas jamais deixe
que eles sufoquem os seus sonhos”

Lewis Carroll

RESUMO

Objetivou-se utilizar aditivo microbiano para verificar a qualidade da silagem de folha de mandioca. A forragem foi submetida aos tratamentos com adição e ausência do inoculante microbiano *Lactobacillus buchneri* cepa NCIMB 40788, dosagem recomendada pelo fabricante, observando-se dados correspondente a quatro repetições, analisadas em seis períodos de 0, 1, 7, 14, 28, e 56 dias de abertura dos silos. A adição do inoculante causou alterações ao longo do processo fermentativo. Foram observados decréscimos significativos para fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e extrato etéreo e acréscimos para matéria seca, proteína bruta, nitrogênio amoniacal, minerais, digestibilidade *in vitro* de matéria seca e carboidratos solúveis. Foram verificadas alterações nas populações de bactérias acidoláticas e enterobactérias. Não foram verificadas alterações nos valores de pH. A inoculação influenciou a produção dos ácidos graxos voláteis, mas ao final do processo a silagem sem inoculante apresentou menor concentração de ácido acético e maior de ácido lático, verificando-se para ácido cianídrico redução a partir do segundo dia de abertura dos silos. O aditivo microbiano não foi eficiente sobre a qualidade da silagem, porém encontra-se em nível nutricional limite a ser fornecida ao animal.

Palavras-chave: aditivo microbiano – bactérias acidoláticas – fermentação – ruminante.

ABSTRACT

The objective was to use a microbial additive containing *Lactobacillus buchneri* to verify the quality of the cassava leaves silage. The forage was submitted to the treatments with addition and absence of microbial inoculant containing *Lactobacillus buchneri* strain NCIMB 40788 the dosage recommended by the manufacturer, observing data corresponding to four replicates, analyzed in six periods of 0, 1, 7, 14, 28, and 56 days of opening the silos. Addition of the inoculant caused changes throughout the fermentation process. Significant decreases were observed for neutral detergent fiber, acid detergent fiber and ethereal extract, and additions to dry matter, crude protein, ammoniacal nitrogen, minerals, dry matter digestibility and soluble carbohydrates. Changes were observed in populations of lactic acid bacteria and enterobacteria. No changes were observed in the pH values. The inoculation influenced the production of the volatile fatty acids, but at the end of the process the silage without inoculant presented a lower concentration of acetic acid and higher of lactic acid, reducing to hydrocyanic acid from the second day of opening of the silos. The microbial additive was not efficient on the quality of the silage, but it is at the nutritional level limit to be supplied to the animal.

Keywords: microbial additive - acidolactic bacteria - fermentation - ruminant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Evolução da produção de raiz de mandioca no Brasil	15
Figura 2 – Vias de fermentação das hexoses por bactérias lácticas	21

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Meios de cultura utilizados para pesquisa de micro-organismos em silagem da folha de mandioca 39
- Tabela 2** – Valores médios da análise bromatológica da ensilagem de folha de mandioca dos tratamentos com e sem aditivo microbiano contendo *Lactobacillus buchneri* 43
- Tabela 3** – valores médios em Log UFCg⁻¹ dos micro-organismos significativamente presentes na silagem de folha de mandioca e equação de regressão para os tratamentos com e sem aditivo microbiano contendo *Lactobacillus buchneri* 46
- Tabela 4** – Valores médios de ácidos da ensilagem de folha de mandioca dos tratamentos com e sem aditivo microbiano contendo *Lactobacillus buchneri*49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1. Características Gerais da Mandioca	14
2.2. O Processo de Ensilagem.....	17
2.3. A Microbiota da Silagem.....	18
2.3.1. Micro-organismos desejáveis.....	19
2.3.1.1. Bactérias ácido lácticos (BAL).....	19
2.3.1.2. Principais vias de fermentação	20
2.3.1.3. Micro-organismos indesejáveis.....	21
2.3.1.4. <i>Clostridium</i>	21
2.3.1.4.1. Enterobactérias	22
2.3.1.5. <i>Listeria</i>	22
2.3.1.5.1. Fungos filamentosos e leveduras	22
2.4. Uso de Inoculantes no Processo de Ensilagem	23
2.5. Inibição da Deterioração Aeróbia da Silagem	24
2.6. Ação do <i>Lactobacillus buchneri</i> sobre a Estabilidade Aeróbia das Silagens	25
CAPÍTULO II – <i>Lactobacillus buchneri</i> em silagem da folha de mandioca	35
2.1. Introdução	37
2.2. Material e Métodos.....	37
2.3. Resultados e Discussão	40
2.4. Conclusões	50
Referências	51
Apêndice	55

1. INTRODUÇÃO

Um dos pontos principais a se tratar e de grande importância para a pecuária é a nutrição animal, por não haver alimentos suficientes para fornecer ao animal em determinadas épocas do ano.

O Brasil é um país, como tantos outros, que sofre mudanças climáticas, ocasionadas por períodos de chuva e seca em suas regiões. As diferentes regiões do país possuem características meteorológicas distintas, onde no nordeste predomina o período de seca em boa parte do ano, resultando em baixos níveis pluviométricos que levam a variações significativas nos índices de produtividade agropecuária.

Na região nordeste do Brasil existem dois perfis climáticos marcantes, o período de chuvas onde se tem grande produção de forragens de boa qualidade, conseqüentemente uma maior produção de animais. O período de seca que se caracteriza pela escassez de alimento, acometendo perdas de produção pela falta de chuvas, tanto na agricultura como na pecuária, causando aos pequenos produtores da região grandes prejuízos.

A mandioca, também conhecida como aipim ou macaxeira, é uma cultura de grande produção na região nordeste, isso devido à grande tolerância da planta aos solos de baixa fertilidade e à seca pela sua rusticidade. Suas raízes são de grande importância para a população de baixa renda, por ser um produto barato e podendo ser consumida na forma cozida, frita, farinha e de outros subprodutos. Entretanto, nem toda mandioca é apropriada para consumo, devido ao alto teor de compostos cianogênicos que a torna tóxica para o ser humano e animal. As cultivares de mandiocas são classificadas como mansa e brava, de acordo com o teor de ácido cianídrico (HCN) presente em suas raízes, estando para consumo apenas as mansas e as bravas sendo utilizadas pela indústria de alimentos para obtenção de subprodutos.

No campo, quando as raízes são retiradas para consumo ou para a indústria, suas hastes são reutilizadas para a propagação do plantio, enquanto que as folhas são descartadas.

Tendo observado o desperdício das folhas da mandioca após a coleta das raízes, alguns técnicos e produtores têm usado o resto da cultura como alternativa de fonte de alimento para animais ruminantes, no período de escassez.

No entanto, a toxicidade encontrada nas folhas da mandioca devido ao alto teor de cianeto não permite que elas sejam fornecidas *in natura* ao animal, devendo passar primeiramente pelo processo de amassar e cortar antes de secá-las. Um dos métodos mais utilizados no processo de conservação de alimentos é a ensilagem do material. A silagem poderá

ser fornecida ao animal como única fonte de alimento ou ser consorciado com outro alimento disponível.

Muito se tem utilizado e pesquisado o uso de aditivos microbianos no processo de ensilagens com a finalidade de se obter mudanças em sua fermentação, elevar seu nível energético, melhorar o valor nutricional e proporcionar estabilidade aeróbia, reduzindo assim as perdas nutricionais.

Portanto, objetivou-se verificar o ganho qualitativo da silagem a partir do uso de aditivo microbiano contendo *Lactobacillus buchneri*, no processo de ensilagem da folha de mandioca.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Características Gerais da Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das principais fontes de carboidratos em diversos países do mundo, cuja área plantada é uma das mais representativas dentre as culturas amiláceas. A capacidade de usar água, eficientemente, permite sua exploração em regiões de estações com secas prolongadas nas quais a cultura ocupa papel predominante nos sistemas de produção agrícola (SILVA et al., 2009).

É conhecida popularmente por aipim ou macaxeira, constitui-se da seguinte classificação botânica: classe *Equisetopsida*, subclasse *Magnoliidae*, ordem *Malpighiales*, família *Euphorbiaceae*, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* Crantz (TROPICOS, 2012). É uma planta perene, embora, comercialmente seja cultivada por um período de um a dois ciclos, visando, principalmente, a produção de raízes feculantes (FIGUEIREDO, 2014).

A mandioca é uma planta perene pertencente à família *Euphorbiaceae*, a qual suas raízes são ricas em fécula, utilizadas na alimentação humana e animal ou como matéria prima para indústrias. A mandioca de mesa, conhecida popularmente por aipim ou macaxeira, é uma espécie cultivada nas regiões tropicais e sua propagação vegetativa resultou em um grande número de variedades com diferentes características morfológicas, adaptando-as à condição de clima e solo, bem como resistência a pragas e doenças (VIEIRA, FILHO, ANDRADE, 2013).

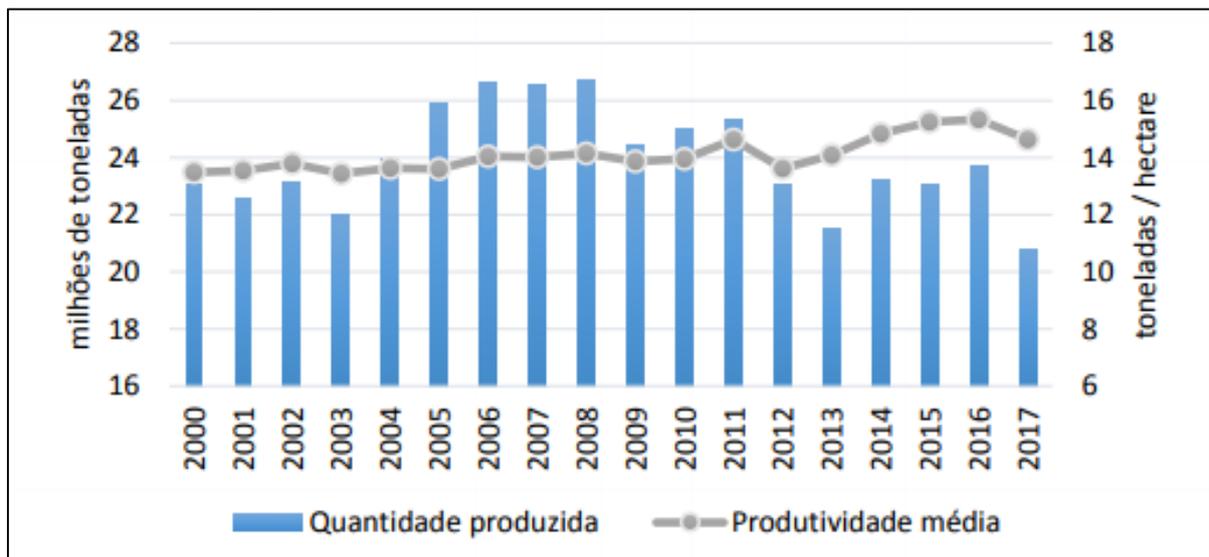
De acordo com Alves (2006), essa planta apresenta cinco fases fisiológicas: 1) emergência: de cinco a quinze dias após o plantio, ocorrendo os primeiros brotos seguidos pelo aparecimento de folhas; 2) desenvolvimento foliar e sistema radicular: de quinze a noventa dias; 3) desenvolvimento de ramos e folhas (estabelecimento de copa), ocorrendo de 90 a 180 dias; 4) translocação de carboidratos para as raízes: de 180 a 300 dias após o plantio; 5) fase de dormência: de 300 dias em diante, quando a taxa de reprodução de folhas torna-se reduzida.

A reprodução ocorre normalmente por meio de propagação vegetativa, embora a produção de sementes botânicas ocorra facilmente nessa espécie. Em função da ampla segregação das plantas oriundas de sementes botânicas originando populações altamente desuniformes para quase todos os caracteres da planta, essas sementes têm sido utilizadas apenas em programas de melhoramento genético e para criar variabilidade (FUKUDA, 1999).

A produção das raízes, mesmo em condições adversas de clima e solo, segundo Souza et al. (2006), é explicada pela rusticidade da planta, sistema radicular profundo e período de repouso fisiológico em épocas com temperaturas amenas e/ou déficit hídrico.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – (Conab, 2017), a produção brasileira de raiz de mandioca atingiu 23,71 milhões de toneladas no ano de 2016, com uma área colhida de 1,55 milhões de hectares. A previsão para 2017 é de que a safra seja 12,3% inferior, sendo estimada em 20,80 milhões de toneladas, devido à redução da área plantada observada na maioria dos estados brasileiros. A Figura 1 ilustra a evolução da produção da raiz de mandioca brasileira ao longo dos últimos anos.

Figura 1: Evolução da produção de raiz de mandioca no Brasil, segundo IBGE.



Fonte: Conab, 2017

A cultura da mandioca está difundida em todo o mundo, sendo que cada região apresenta especificidade no processo de produção, consumo e beneficiamento. O cultivo desta espécie não está ligado exclusivamente ao consumo familiar, muitas vezes faz parte da renda familiar, com a produção de farinha, biscoito e bolos. Além disso, sua versatilidade despertou o interesse também da indústria têxtil, de celulose e alguns produtos farmacêuticos (SOUZA & HARDT, 2002; LEONEL, 2005; NASSAR & ORTIZ, 2010).

Diferencia-se da mandioca industrial, brava ou amarga por ter sabor característico suavemente adocicado, enquanto a mandioca industrial pode ter qualquer sabor: adocicado, neutro ou amargo. O sabor amargo está associado à alta concentração de substâncias tóxicas

(cianetos), e por isso são destinadas à indústria para serem processadas em farinha ou amido (VALLE et al., 2004).

Além da grande utilização das raízes, as partes aéreas da mandioca também despertam interesse, pois apresentam boas características de fermentação, sendo também utilizadas como silagem na alimentação animal (FAUSTINO et al., 2003; MODESTO et al., 2004; PINHO et al., 2004; FALKENBERG et al., 2005).

A parte aérea da mandioca é considerada como aproveitável para alimentação animal, quando perdida no campo durante a colheita das raízes (EUCLIDES et al., 1988), é um alimento volumoso com bom valor nutritivo que pode contribuir na alimentação dos animais ruminantes, especialmente com relação ao elevado teor proteico (FAUSTINO et al., 2003).

A constante procura nos últimos anos por alternativas de alimentos não competitivos com a alimentação humana, vem incentivando estudos de maneira a utilizar os recursos regionais disponíveis para ser utilizado na alimentação animal, tornando assim, as rações menos onerosas. Desta forma, métodos e procedimentos são avaliados para que tais alimentos sejam utilizados de forma adequada (FAUSTINO et al., 2003).

A parte aérea da mandioca é constituída pelas hastes principais, galhos e folhas em proporções variáveis. Considerada como resíduo gerado da colheita das raízes que possui ótimas características nutricionais (FERRI, 2006).

A utilização da folhagem da mandioca ocorre por serem, muitas vezes descartadas, principalmente na estação das águas quando os pecuaristas não necessitam muito do material devido a boa disponibilidade de forragem nas pastagens (SOBRAL et al., 2014).

As folhas da mandioca são consideradas subprodutos que apresentam oscilação no teor de proteína com a idade da planta, porém não são deficientes em nenhum dos aminoácidos essenciais, sendo possível sua aplicação como ingrediente alimentício para a melhoria do aspecto nutricional do produto (SAGRILO et al., 2003; ORTEGA-FLORES et al., 2003).

A toxicidade das folhas de mandioca, ocasionada pelo teor de cianeto, restringe o uso *in natura*. A melhor forma de manuseio para a redução do teor de ácido cianídrico é a técnica de amassar e rasgar as folhas antes de secá-las (TROMBINI & LEONEL, 2014).

O rendimento forrageiro e o valor nutritivo da parte aérea da mandioca são influenciados pela variedade e pela fração da parte aérea utilizada como forragem, assim como pela sua adequação para ensilagem (AZEVEDO et al., 2006).

As folhas da mandioca podem ser fornecidas *in natura*, feno ou silagem, de modo que suas características nutritivas e fator de toxicidade estejam adequados para o consumo animal. O fornecimento da rama da mandioca fresca só pode ocorrer em casos que o produtor tenha certeza

de que a espécie cultivada é mansa, sabendo-se que a mandioca mansa não apresenta níveis altos de ácido cianídrico (<50 mg), desta forma não é tóxico para ruminantes, no caso, bovinos de leite (ALVES & COSTA, 2010).

De acordo com ALMEIDA & FILHO (2005) a recomendação do fornecimento *in natura* da folhagem somente pode ser feito de 12 a 24 horas depois de colhida, para reduzir o princípio tóxico a níveis seguros, no caso de espécies com níveis um pouco mais altos de ácido cianídrico, já para espécies tidas como muito bravas a rama deve ser misturada com outro tipo de volumoso, até a proporção máxima de 50% de rama.

2.2. O Processo de Ensilagem

A silagem da rama da mandioca pode constituir-se da única fonte de material ensilado ou ser consorciado, assim como o seu fornecimento também pode ser em substituição ao milho, por exemplo (ALVES & COSTA, 2010).

O método de ensilagem consiste no processo em que logo após a colheita deve-se cortar as ramas, amontoando-as próximo à picadeira e eliminando a parte basal das manivas, se estiverem muito lenhosas. Picar em pedaços de 1 a 2 cm e encher os silos com rapidez, compactando o material a cada camada de 20 cm para expulsar o ar (O₂). Vedar o mesmo com lona plástica e aguardar, no mínimo, 30 dias para a sua abertura. As operações devem ser realizadas com rapidez para que se obtenha uma silagem de boa qualidade (ALMEIDA e FILHO, 2005).

A ensilagem é um método de conservação de forragem que, há muito tempo, vem sendo proposto no Brasil devido à sazonalidade de produção de forrageiras ao longo do ano, levando a períodos de grande produção, seguidos de estiagem (FAUSTINO et al., 2003), geralmente controlando a atividade microbiana pela combinação entre o ambiente anaeróbico com a fermentação natural dos açúcares (JOBIM et al., 2007).

Segundo Carvalho et al., (1983), o processo de ensilagem pode apresentar também alguns problemas como o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis pela inadequada compactação da forragem no silo, mas comparando-o com o processo de fenação, tem algumas vantagens como a menor dependência dos fatores climáticos além de evitar a excessiva perda de folhas.

O fator mais importante que influencia a eficiência desse processo de conservação é o grau de anaerobiose obtido em todo silo, em todas as fases do processo (WOOLFORD, 1990), conseqüentemente, a forragem passa por uma fermentação ácida em que as bactérias produzem os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico utilizando açúcares presentes no material

originando o crescimento de micro-organismos deterioradores que são intolerantes às condições ácidas (WOOLFORD, 1984).

Durante o processo de ensilagem a compactação é uma das fases mais importantes, pois a massa de forragem mal compactada pode gerar fermentações indesejáveis devido à presença de bactérias que degradam o alimento na presença de oxigênio. Inoculantes bacterianos estão entre os principais aditivos utilizados no processo de ensilagem a fim de sanar problemas futuros com a deterioração da massa por microrganismos indesejáveis, através da rápida produção de ácido láctico e consequente diminuição do pH. Esses inoculantes compreendem principalmente bactérias homo fermentativas produtoras de ácido láctico (RÊGO et al, 2014).

No entanto, tais inoculantes quando utilizados isoladamente podem aumentar a deterioração aeróbia (FILYA et al., 2000; FILYA, 2003) das silagens na fase de desabastecimento do silo, pois concentrações elevadas de ácido láctico tornam-se substrato para organismos aeróbios e as baixas concentrações de ácidos graxos de cadeia curta como propiônico e acético colaboram para insuficiente proteção da massa contra leveduras e fungos (MOON, 1983). Diante disso, a utilização de bactérias produtoras de ácido propiônico teria como função fermentar açúcares e lactato a acetato e propionato, fazendo com que estes ácidos alifáticos de cadeia curta inibissem bolores e leveduras na fase aeróbia (FILYA et al., 2004).

2.3. A Microbiota da Silagem

A composição da microbiota da silagem se baseia em dois grupos de micro-organismos, os desejáveis, que estão associados ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL), que podem estar presentes na planta ou serem adicionadas à silagem através de inoculantes. Os micro-organismos indesejáveis são os responsáveis pela deterioração da silagem quais estão relacionados a qualidade da mesma, podendo ser por anaerobiose e aerobiose por meio de contaminação.

A presença de oxigênio desencadeia a proliferação de micro-organismos oportunistas presentes na massa (leveduras, fungos filamentosos e bactérias aeróbias) que se desenvolvem a cargo de substâncias energéticas presentes na forragem, levando ao consumo destes nutrientes, o que acarreta perdas no valor nutritivo da silagem e redução do consumo pelos animais (LINDGREN et al., 1985).

A população epífita presente na forragem é bastante variável afetando diretamente a dinâmica da fermentação, onde são encontradas bactérias ácido lácticas, micro-organismos

aeróbios, fungos filamentosos e leveduras. O número de micro-organismos epífitos é variável, de acordo com o tipo de forragem, estágio de maturidade das plantas, clima, corte e condicionamento das forrageiras. Durante a ensilagem, há alteração nas espécies e tamanho de suas populações (LIN et al., 1992). A mudança de ambiente dentro do silo, que se torna anaeróbio e ácido, propicia a proliferação de bactérias que contribuem positivamente para a silagem, levando à fermentação láctica (PHALOW et al., 2003).

De acordo com Pedroso (2003) esses micro-organismos naturalmente presentes nas plantas forrageiras, que são responsáveis pela fermentação das silagens, afetam também a sua estabilidade aeróbia e a eficiência dos inoculantes microbianos.

Geralmente, os micro-organismos epífitos existentes em maior número nas plantas forrageiras são as enterobactérias, as leveduras e os fungos filamentosos, que competem com os lactobacilos pelos açúcares durante a ensilagem, sendo considerados indesejáveis (WOOLFORD, 1990; HEDERSOM, 1991; BOLSEN et al., 1992).

2.3.1. Micro-organismos desejáveis

2.3.1.1. Bactérias ácido lácticos (BAL)

As bactérias acidoláticas (BAL) fazem parte da microbiota presente no material vegetal. Essa população em geral é inicialmente baixa, aumentando substancialmente entre a colheita e a ensilagem. É o principal grupo fermentativo de micro-organismos atuantes na conservação do material ensilado, tendo como destaque os micro-organismos dos grupos *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (ÁVILA, 2007).

As bactérias lácticas podem ter forma de cocos ou bacilos, ocorrem em cadeia ou isoladamente, são gram-positivas, não apresentam motilidade, não formam esporos, são anaeróbicas ou anaeróbicas facultativas, microaerófilas, não patogênicas (gozando do status “GRAS” – Generally Recognised as Safe), são incapazes de sintetizar ATP através da respiração, catalase negativa, não produzem indol e ácido sulfídrico; apresentam-se em colônias pequenas, a produção de pigmento é rara, mas se presente, pode ser amarela ou laranja escuro, ou ainda, vermelho escuro (BUCHANAN et al., 1974; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

A classificação das BAL, em diferentes grupos, baseia-se na sua morfologia, no modo de fermentação da glucose, do crescimento a diferentes temperaturas, na adaptação a ambientes ricos em nutrientes para produzirem ácido láctico, na habilidade de crescer em altas concentrações de sal (NaCl) e o fato de apresentarem tolerância a meios ácidos ou alcalinos (SALMINEM & WRIGTH, 1998).

As bactérias deste grupo requerem nutrientes complexos para seu desenvolvimento, assim como aminoácidos, peptídeos, ácidos nucleicos e derivados, vitaminas, sais e ácidos graxos, possuindo uma habilidade limitada para sintetizar vitaminas do complexo B e aminoácidos. Obtém energia através da fermentação de açúcares podendo ser produto final do seu metabolismo o lactato, acetato, formiato, succinato, dióxido de carbono e etanol. A temperatura ótima de crescimento varia entre 30 a 40° C, são acidófilas, toleram níveis de pH baixos, o seu pH ótimo varia em torno de 5,5 a 5,8, crescendo preferencialmente a um pH entre 5,0 e 4,5; em pH neutro ou em reações alcalinas há uma diminuição na produção de ácido e o crescimento diminui (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

2.3.1.2.Principais vias de fermentação

Existem duas vias principais de utilização de açúcar pela BAL na fermentação que são a glicólise ou a via de Embden – Meyerhof – Parnas (EMP) e a via das pentoses fosfatos. As BAL são classificadas de acordo com as vias utilizadas em homofermentativas, heterofermentativas obrigatórias e heterofermentativas facultativas (MADIGAN et al., 2010).

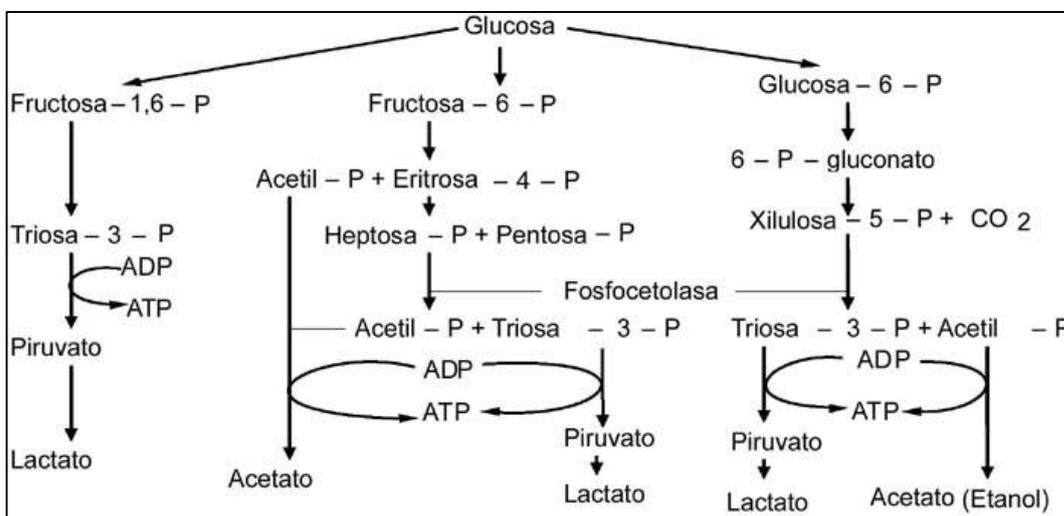
As bactérias acidoláticas homofermentativas fermentam as hexoses como a glicose, pela via glicolítica, pois possuem apenas a enzima aldolase, como por exemplo *Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus ruminis* (AXELSSON, 2004). Essa via é caracterizada pela formação de frutose 1,6 – difosfato (FDP), a qual é quebrada por uma aldolase em dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP). Nesta via, o piruvato é reduzido a ácido lático por uma enzima NAD⁺ dependente, a lactato desidrogenase, com a reoxidação do NADH formado durante as etapas da glicólise. Os desvios nessa rota metabólica podem levar à formação de outros compostos como acetato, etanol, acetona, diacetil e 2,3-butanodiol na fermentação homolítica, para cada 1 mol de glicose metabolizado são gerados 2 mols de ácido lático e 2 mols de ATP (FONTES, 2009).

As heterofermentativas, representadas pelas espécies *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* e *Enterococcus faecium*, são semelhantes aos mencionados anteriormente, contudo, também são capazes de fermentar pentoses em ácidos lático e acético, pois contêm a enzima aldolase constitutiva e a fosfoquetolase. As BAL heterofermentativas obrigatórias, fermentam hexoses e pentoses, pela via fosfogluconato, em ácidos lático e acético, etanol e dióxido de carbono e podem ser representados pelas espécies *L. brevis* e *L. buchneri* (HAMMES & HERTEL, 2003; AXELSSON, 2004).

As heterofermentativas pertencentes aos gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Lactobacillus*, por sua vez, utilizam a via fosfatoaldolase ou via das pentoses para fermentação

das hexoses (WISSELINK et al., 2002). Ausência da enzima frutose 1,6-difosfato aldolase, leva à formação da xilulase 5-fosfato e acetilfosfato. Esta via é caracterizada pela quebra dessa pentose por uma fosfatoaldolase em gliceraldeído – 3 – fosfato e acetilfosfato (WEYMARN, 2002). Portanto, um mol de glicose é convertido em quantidades equimolares de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono, havendo formação de 1 mol de ATP (COGAN e JORDAN, 1994). Sob condições anaeróbicas, compostos como piruvato, glicerol e frutose são utilizados como aceptores alternativos de elétrons (FONTES, 2009), (Figura 2).

Figura 2: Vias de fermentação das hexoses por bactérias lácticas.



Fonte: KANDLER, 1983.

2.3.1.3. Micro-organismos indesejáveis

2.3.1.4. Clostridium

Os clostrídios são micro-organismos anaeróbios, seus efeitos na qualidade da silagem geralmente ocorrem muito tempo depois que as bactérias acidoláticas param de crescer ativamente no silo, sendo responsáveis pela fermentação butírica, se desenvolvendo em pH mais elevado (PAHLOW et al., 2003). São classificados de acordo com os componentes que utilizam como substrato. Podem fermentar aminoácidos, carboidratos, ácido láctico e produzir diversos componentes, como amônia, aminas, ácido butírico e acético, hidrogênio e dióxido de carbono (MUCK, 2010). Com a elevação do pH, a silagem torna-se menos estável. Silagens confeccionadas com pouca higiene, com alto contato com terra e esterco estão mais propensas ao aparecimento de clostrídios (WILKS et al., 2003). Em função da pressão osmótica, a colheita da forragem com 30 a 35% de MS garante a ausência dessas bactérias (PEREIRA et al., 2014).

2.3.1.4.1. Enterobactérias

As enterobactérias competem fortemente por substrato com as BAL, sendo o segundo maior grupo de bactérias presentes na microbiota epifítica no silo (PAHLOW et al., 2003). Algumas bactérias dessa família são preocupantes à saúde, por serem patogênicas. Dentre elas, estão presentes a *Escherichia coli* e o gênero *Salmonella* (WILKS et al., 2003). São bactérias anaeróbias facultativas, que fazem uso de nitrato como aceptor de elétrons no lugar do O₂, reduzindo-o a nitrito ou óxido nítrico, com geração de gases (MUCK, 2010). Além disso, são adaptáveis a condições adversas, como baixo pH (PEREIRA et al., 2014). Para controlar seu desenvolvimento, é necessário propiciar fermentação adequada, com substrato e disponibilidade de água suficientes para as BAL (PAHLOW, 2003). Penteado et al. (2007) usaram *L. buchneri* em silagens, para dominar a fermentação e, verificaram que doses acima de 1 x 10⁵ UFC g⁻¹ foram eficientes para diminuir a população de enterobactérias.

2.3.1.5. *Listeria*

A *Listeria monocytogenes* constitui-se de uma célula pequena, móvel, gram-positiva, não esporulada, saprófita que vive no solo, nas plantas e pode ser encontrada em secreções de animais aparentemente saudáveis. Pode sobreviver por até dois anos no solo seco e nas fezes e é capaz de crescer sob temperaturas de 4 a 44 °C (WOOLFORD, 1990).

O desenvolvimento desses microrganismos está diretamente ligado ao pH da silagem, observando-se inibição do crescimento quando o pH é de 5,2, mas sua perda de viabilidade ocorre somente em pH mais ácido. Em silagens com pH elevado, poderá ocorrer desenvolvimento de *Listeria*, salvo se o teor de matéria seca for muito elevado, em torno de 70% (CORROT, 1998). Contudo, em algumas situações especiais, foi relatada a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em silagens com pH de 3,8 a pH 4,5 (FENSTERBANK et al., 1984; OSTLING & LINDGREN, 1993; RYSER et al., 1997).

2.3.1.5.1. Fungos filamentosos e leveduras

As leveduras, fungos unicelulares, prejudiciais as silagens, principalmente durante sua utilização, quando a silagem entra novamente em contato com o ar (MCDONALD et al., 1991). No silo fechado, onde não há presença de O₂, esses microrganismos fermentam os açúcares, produzindo ácido butírico, ácido acético, hidrogênio e CO₂ e os aminoácidos, com produção de amônia, aminas e CO₂, o que diminuiu o valor nutritivo da forragem e, como consequência, menor ingestão pelos animais (MUCK, 2010).

Com o mal manejo das silagens, é possível encontrar fungos filamentosos, sobretudo as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (MCDONALD et al., 1991). A presença desses micro-organismos na forragem ensilada além de consumir o conteúdo celular, pode acarretar na produção de toxinas que afetam o metabolismo animal (REIS et al., 2006; NIVINSKI, 2013).

Os produtos dos fungos filamentosos, as micotoxinas, apresentam efeitos tóxicos aos animais, com a intensidade dependente do tempo de exposição e dose. Animais jovens e/ou de alta produtividade são mais sensíveis, e sujeitos a maiores prejuízos (ALMEIDA & OSTRENSKY, 2011). O material deteriorado deve ser descartado para evitar essa contaminação, entretanto, muitas vezes isso não é feito, podendo acarretar grandes prejuízos na produção, desde baixo valor nutritivo da forragem até problemas com intoxicação (BERNARDES & REGO, 2014).

2.4. Uso de Inoculantes no Processo de Ensilagem

O uso de aditivos microbiológicos em silagens tem por objetivo 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 clostrídios, inibir a atividade de proteases e deaminases da planta e de micro-organismos, adicionar micro-organismos 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).

A obtenção de sucesso no uso de aditivos microbiológicos em silagens depende da habilidade da bactéria inoculada crescer rapidamente na massa de forragem ensilada, da presença de substrato adequado e da população de bactérias inoculadas em relação à população epífita da forragem (ZOPOLLATTO et al., 2009). Fazendo-se necessárias aproximadamente 10^8 bactérias ácido lácticas por grama de forragem para que o pH decline rapidamente. Com tudo, esta concentração é muito superior à suprida pelos aditivos microbiológicos, e neste caso, o inoculante deve apresentar rápida taxa de crescimento na forragem recém armazenada (MUCK, 1988).

Segundo ÁVILA et al. (2011), os aditivos a base de inoculantes microbianos são considerados benéficos por produzirem ácidos que diminuem o pH, no entanto, eles podem ser prejudiciais quando degradam proteínas, produzem compostos tóxicos para os animais e até para humanos, ou quando competem com microrganismos benéficos pelo substrato, agravando a qualidade da silagem. Seguindo este princípio, o tempo de permanência da vedação do silo

tem que ser suficiente para que ocorra o processo de fermentação, com abaixamento do pH a níveis que impeçam o crescimento de micro-organismos indesejáveis (PINTO et al., 2007).

São apontadas algumas hipóteses para o insucesso da utilização de inoculantes em silagens. Destacando-se a atividade competitiva de população epífita da planta originada a partir de cepas selvagens, o baixo teor de açúcares da forragem, os efeitos do antecedente histórico da cultura agrícola utilizada como fonte de forragem, excesso de oxigênio, extremos de atividade de água na massa ensilada e problemas na aplicação do produto (MUCK & KUNG JR, 1997; KUNG JR. et al, 2003).

No Brasil, visando acelerar o processo fermentativo e maior eficiência na preservação das silagens, o uso de inoculantes microbianos tem sido adotado em muitas propriedades rurais (REGO, 2014; SILVA et al., 2015). Dentre as bactérias mais utilizadas como inoculantes para silagens, destacam-se as heteroláticas *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentacaceus* e *Enterococcus faecium*, produtoras de ácido lático a partir da fermentação de açúcares simples, resultando em perdas mínimas de energia e matéria seca (SIQUEIRA, 2005).

A avaliação da eficácia de uso de aditivos em silagens, geralmente é realizada em silos de escala laboratorial, por permitir uma estimativa confiável de forma rápida e de baixo custo (MICKAN et al., 2004; HOEDTKE & ZEYNER, 2011).

2.5. Inibição da Deterioração Aeróbia da Silagem

Para que se possa produzir uma silagem de boa qualidade de uma forrageira, esta deve obedecer a alguns requisitos, como teor de MS adequado no momento da ensilagem (30 a 35% de MS); alta concentração de carboidratos solúveis (CHO) e baixo poder tampão. Contudo, sabe-se que nem todas as forrageiras apresentam tais características em função da própria planta e/ ou das práticas de manejo (ÁVILA, 2007).

A estabilidade da silagem é determinada pela fermentação aeróbia (pós-fermentação) que ocorre após a abertura do silo. A pós-fermentação será mais intensa, quanto melhor for a qualidade da silagem, em função dos maiores teores de carboidratos solúveis e de ácido lático residuais. Os principais substratos utilizados pelos micro-organismos envolvidos no processo, são os ácidos, o etanol e os açúcares solúveis, resultando em aumento do pH e redução na digestibilidade e no conteúdo de energia (MUCK & SHINNES, 2001).

A estabilidade aeróbia é um termo usado para definir a resistência que a massa ensilada oferece à deterioração após ser exposta ao ar (KUNG JUNIOR & RANJIT, 2001). A deterioração das silagens além de causar perdas de matéria seca e de valor nutricional, também

pode apresentar efeitos na qualidade higiênica das silagens com risco de proliferação de micro-organismos indesejáveis ou patogênicos como os fungos, bacilos, *Listeria monocytogenes*, dentre outros, podendo acumular suas toxinas na silagem com efeitos negativos na saúde animal e humana (BORREANI & TABACO, 2010).

As vantagens de utilizar aditivos biológicos são a sua segurança e facilidade de uso, além de não serem corrosivos para o maquinário, não poluírem o meio ambiente e serem produtos naturais. Assim sendo, existe um grande número de estudos relacionados ao uso de inoculantes em silagens; contudo, os resultados ainda são contraditórios em relação à melhoria no processo fermentativo, no valor nutritivo, na digestibilidade das silagens, no consumo de MS e no ganho de peso (ÁVILA, 2007).

A deterioração aeróbia da silagem está associada principalmente, com o desenvolvimento de fungos e leveduras segundo Muck et al. (1991) e Ruiz e Munari (1992) o processo inicia-se com leveduras, que transformam os açúcares em álcool. Esses micro-organismos apresentam alta resistência às variações do pH e sobrevivem em meio anaeróbio. Particularmente as leveduras *Candida Krusei*, *Pichia fermentans* e *Hansenula anomala* são iniciadoras do processo de deterioração da silagem. Em uma etapa subsequente bactérias (*Bacillus cereus*, *B. firmes*, *B. lentus* e *B. sphaericus*) podem estar envolvidas no processo de deterioração.

Silagens, que na abertura do silo, apresentam contagem de 10^6 UFC (Unidade Formadora de Colônia) de leveduras/grama de silagem podem em dois ou três dias atingir 10^9 UFC/grama sendo consideradas de baixa estabilidade (PITT et al., 1991).

A exposição ao oxigênio proporciona o crescimento de micro-organismos aeróbios facultativos que sobreviveram inativos na ausência do oxigênio. Esses micro-organismos utilizam da forragem ou indiretamente da fermentação. Estando essa fase, associada com perdas de nutrientes e é definida como deterioração aeróbia, na qual, tipicamente um ou dois picos de temperatura são determinados em função da atividade de leveduras e fungos filamentosos (NISHINO et al., 2003).

2.6. Ação do *Lactobacillus buchneri* sobre a Estabilidade Aeróbia das Silagens

Em relação aos inoculantes heterofermentativos, o *Lactobacillus buchneri* é uma das BAL mais pesquisadas na comunidade científica, com destacado efeito sobre a estabilidade aeróbia das silagens (TAYLOR et al., 2002; KLEINSCHMIT, SCHMIDT; KUNG JR., 2005; BASSO et al., 2012). Esta bactéria converte glicose e frutose à ácido lático e outros produtos finais (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991), sua ação sobre micro-organismos

aeróbios ocorre por meio da conversão anaeróbia de ácido lático em ácido acético, além da produção de 1,2-propanodiol, etanol e CO₂ (OUDE ELFERINK et al., 2001), retardando o crescimento de leveduras e fungos filamentosos presentes na silagem (MOON, 1983).

O *Lactobacillus buchneri* tem maior afinidade para metabolizar ácido lático em pH 3,8 do que em pH 4,3 e a habilidade em converter ácido lático em acético e 1,2-propanodiol que é expressa somente em pH inferior a 5,8 (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Na conversão de ácido acético pelo *L. buchneri*, um terço da matéria seca é perdida em CO₂ (1 a 25% MS), entretanto a presença de ácido acético pode compensar as maiores perdas pela ação de micro-organismos aeróbios após a abertura do silo (WEINBERG; MUCK, 1996). A fermentação heterolática é menos eficiente que a homolática especialmente se o açúcar predominante for a frutose, o que ocorre em capins de clima temperado (MCDONALD, HENDERSON; HERON, 1991).

O ácido acético proporciona melhorias na estabilidade aeróbia das silagens, por suas características antifúngicas. Isso porque o pH do meio é inferior ao seu pKa, o que faz com que ele esteja na forma não dissociada. Desse modo, entrando na célula microbiana através da sua membrana via transporte passivo. Uma vez que dentro da célula, o ácido é dissociado, em razão do pH interno ser próximo a 7,0 e ocorrer a liberação dos íons H⁺, acidificando o meio intracelular (LAMBERT; STRATFORD, 1999). No entanto, para manter a neutralidade da célula, os micro-organismos eliminam os íons por transporte ativo, levando a um gasto de energia que prejudica seu crescimento e multiplicação, podendo leva-lo à morte.

O uso de bactéria heteroláticas, como o *Lactobacillus buchneri*, tem proporcionado resultados promissores no aumento da estabilidade aeróbia em silagens e ganhos no desempenho de bovinos leiteiros (KUNG et al., 2003). Para Driehuis et al. (2001), a aplicação conjunta de bactérias homofermentativas e *L. buchneri* na ensilagem pode acelerar a fermentação láctica inicial e reduzir a susceptibilidade de deterioração pelos micro-organismos aeróbios, assim, Nishino et al. (2003), ressaltam que a fermentação pela bactéria *L. buchneri* além de produzir ácido acético, o 1,2-propanodiol, pode também, quando ingerido, ser transformado em ácido propiônico pela bactérias ruminais, o que melhoraria o desempenho de animais ruminantes.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.; FERREIRA FIHO, J.R. Mandioca uma boa alternativa para alimentação animal. **Bahia Agrícola**, salvador, v. 7, n. 1, p. 50-56, 2005.
- ALMEIDA, R.; OSTRENSKY, A. Aditivos para gado leiteiro. p. 217-256. In: **Anais do 9º Simpósio Sobre Nutrição de Bovinos**. Piracicaba, São Paulo, 2011.
- ALVES, A.A.C. Fisiologia da mandioca. In: **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, v.7, p. 138-169, 2006.
- ALVES, J. R.; COSTA, E. P. S. **Importância do uso da rama de mandioca na alimentação do gado leiteiro**. 2010. Disponível: <http://www.emater.ro.gov.br/siteemater/arquivos/publicacoes/23062010143543.pdf> (acesso em 09 de Mar de 2018).
- ÁVILA, C. L. S. **Isolamento e uso de *Lactobacillus buchneri* na ensilagem de capim-Mombaça e cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 197, 2007.
- AXELSSON, L. **Lactic Acid bacteria: classification and physiology**. In: Salminen, S.; ON WRIGHT, A. (Ed). Lactic Acid bacteria. New York: Marcel Dekker, p. 1-63, 2004.
- AZEVEDO, E. B; NÖRNBERG, J. L.; KESSLER, J. D., BRUNING, G.; DAVID, D. B.; FALKENBERG, J. R.; CHIELE, Z. G. Silagem da parte aérea de cultivares da mandioca. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1902-1908, 2006.
- BASSO, F. C.; BERNARDES, T. F.; ROTH, A. P. T. P.; LODO, B. N.; BERCHIELLI, T. T. E REIS, R. A. Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia** 41:1789-1794, 2012.
- BERNARDES, T. F.; REGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal Dairy Science** 97: 1852-1861, 2014.
- BOLSEN, K. K; LIN, C.; BRENT, B. E.; FEYERHERM, A. M.; AIMUTIS, W. R.; URBAN, J. E. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3066-3083, 1992.
- BORREANI, G.; TABACCO, E. The relation ship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2620-2629, 2010.

- BUCHANAN, J. B.; KINGSTON, P. F.; SHEADER, M. Long-term population trends of the benthic macrofauna in the off shore mud of the Northumberland coast. Cited by 32, **Get access**, Volume 54, Issue 4 , p. 785-795, 1974.
- CARVALHO, J. L. H.; PERIM, S.; COSTA, I. R. S. Part Air cassava in animal feed. I. **Nutritive value and quality of silage**. Planaltina: EMBRAPA, CPAC, (Embrapa, CPAC Technical Communication, 29), p. 6, 1983.
- CATO, E. P.; GEORGE, W. L.; FINEGOLD, S. M. 1986. **The genus *Clostridium***. p. 1114- 1200. In: Sneath et al., 1986.
- COGAN, T. M; JORDAN, K. N. Metabolism of *Leuconostoc* Bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 77, Iss. 9, p. 2704-2717, 1994.
- CONAB, Conjunturas da Agropecuária. Mandioca: Raiz, fécula e farinha. Abril, 2017. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_16_14_33_30_17.pdf Acesso em 07 mar de 2018.
- CORROT, G. **Qualité bacteriologique de l'enrubannage: spores butyriques et *Listeria***. Recolter & Conserver L'herbe aujourd'hui. Paris: Association Française. p. 197, 1998.
- DRIEHUS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristic and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 330-343, Dec. 2001.
- EUCLIDES, V. P. B.; S'THIAGO, L. R. L.; SILVA, J. M.; O'DONOVAN, P. B. Efeito da suplementação de rama de mandioca e grão de sorgo sobre a utilização da palha de arroz por novilhos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.23, n.6, p.631-643, 1988.
- FALKENBERG, J.R. et al. Características fermentativas e bromatológicas de silagens da parte aérea de diferentes cultivares de mandioca. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: SBZ, 2005.
- FAUSTINO, J. O.; SANTOS, G. T.; MODESTO, E. C.; SILVA, D. C.; SAKAGUTI, E. S.; DAMASCENO, J. C.; MARQUES, J. A.; ZAMBOM, M. A. Efeito da ensilagem do terço superior da rama de mandioca triturada ou inteira e dos tempos de armazenamento. *Acta Scientiarum*. **Animal Science**, v. 25, n. 2, p. 403-410, 2003.
- FENSTERBANK, R.; AUDURIER, A.; GODU, J.; GUERRAULT, P.; MALO, N. Etude des souches de *Listeria* isolees d'animaux malades et de l'ensilage consomme. **Ann. Rech. Vet.** 15:113-118, 1984.

- FERRI, P. **Extração de proteínas de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para obtenção de concentrado proteico.** Cascavel: PR, 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Centro de Ciências Exatas e Tecnológica, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Cascavel, p. 11, 2006.
- FILYA, I.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; WEINBERG, Z. G. The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of whole crop wheat silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 39 - 46, 2000
- FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 95, n. 5, p. 1080-1086, 2003.
- FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 97, n. 4, v. 818 - 826, 2004.
- FONTES, C. P. M. L. **Produção de manitol a partir da fermentação do suco de caju utilizando bactérias lácticas heterofermentativas.** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, Master Dissertation. 2009.
- FUKUDA, W. M. G. Melhoramento da mandioca. In: BORÈM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 409-428.
- HEMMES, W.P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In.: **The Prokaryotes, na evolving electronic resource for the microbiological communit.** New York – Springer-Verlag, p. 320- 403, 2003.
- HENDERSOM, A.R. Biochemistry in forage conservation. **Conference of Conservation Towards 2000.** Brandschweig (23-25 Jun). 1991.
- KARINHOFVENDAHL^ABÄRBELHAHN–HÄGERDAL. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 26, Issues 2–4, February 2000, Pages 87-107
- JOBIM, C.C., NUSSIO, L. G., REIS, R. A.; et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, suppl. 0, p 101-119, 2007.
- KANDLER, O. **Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria.** *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209-224, 1983.
- KLEINSCHMIT, D. H.; SCHMIDT, R. J. AND KUNG JR., L. 2005. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal Dairy Science**, 88: 2130-2139

- KUNG JR., L.; RANJIT, N. K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of Dairy Science*, v. 84, n. 5, p. 1149-1155, 2001.
- 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**. 1. ed. Madison: American Society of Agronomy, p.305 – 360, 2003.
- LAMBERT, R. J.; STRATFORD, M. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 157-164, 1999.
- LIDGREN, S.; PETTERSSON, K.; KASPERSSON, A.; JONSSON, A.; LINGVALL, P. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. **Journal Science Food Agriculture**, v. 36, p. 765-774, 1985.
- LIN; C.; BRENT, B. E.; BOLSEN, K. K.; FUNG, Y. C. **Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and corn**. In: *Cattlemen's Day*. Kansas State University, Manhattan. . p.113, 1992.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK; D.P. **Microbiologia de Brock**. Traduzido de Brock Biology of Microorganisms. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. **Biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe Publication, p. 340, 1991.
- MODESTO, E.C.; SANTOS, G.T.; VILELA, D. Caracterização químico-bromatológica da silagem do terço superior da rama de mandioca. **Acta Scientiarum**, v.26, n.1, p.137-146, 2004.
- MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid-tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 454-460, 1983.
- MUCK, R.; KUNG JR., L. Effects of silage additives on ensiling. In: **Silage Field to Feed bunk NRAES-99**. Hershey, 1997.
- MUCK, R. E. Factors influencing silage quality and their implications for management. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2992- 3002, 1988.
- 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. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39:183-191, 2010.
- MUCK, R. E.; SCHINNES, K. J. Conserved forages (silage and hay): Progress and priorities. In: **INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESSO**. São

Pedro. Proceedings... Piracicaba: Brazilian Society of Animal Husbandry, p. 753-762. 2001.

MUCK, R.E., BOLSEN, K.K. Silage preservation and additive products. **Field Guide and Silage Management in North America**, p. 105-126, 1991.

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

NOVINSKI, C. O. **Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens em infravermelho**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2013.

ORTEGA-FLORES, C. I. et al. Avaliação da qualidade proteica da folha desidratada de mandioca *Manihot esculenta* Crantz. **Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 47-59, 2003.

ÖSTLING, C. E. AND LINDGREN, S. E. 1993. Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. **Journal Appl Bacteriol**, 18-24.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; KROONEMAM, J.; GOTTSCHAL, J. A.; SPOELSTRA, S. F.; FABER, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 125-132, Jan. 2001.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA, p.31-93, 2003.

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

PENTEADO, D.C.S. et al. Inoculação com *Lactobacillus plantarum* da microbiota em silagem de capim-Mombaça. **Archivos Zootecnia**, v.56, p. 191-202, 2007.

PEREIRA, O. G.; SILVA, T. C.; LEANDRO, E. S.; RIBEIRO, K. G. 2014. Práticas na ensilagem versus qualidade higiênica da silagem. p. 157-210. In: **Anais do V Simpósio: Produção e Utilização de Forragens Conservadas**. Maringá, Paraná.

PHILLIP, L.E., FELLNER, V. Effects of Bacterial Inoculation of High-Moisture Ear Corn on Its Aerobic Stability, Digestion, and Utilization for Growth by Beef Steers. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 3178-3187, 1992.

PINHO, E.Z.; COSTA, C.; ARRIGONI, M. B.; SILVEIRA, A. C.; PINHO, S. Z. Fermentation and nutritive value of silage and hay made from the aerial part of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Scientia Agricola**, v.61, n.4, p.364- 370, 2004.

PINTO, A.P.; MIZUBUTI, I.Y.; RIBEIRO, E.L.A.; FEY, R.; PALUMBO, G.R.; ALVES, T.C. Avaliação da silagem de bagaço de laranja e silagem de milho em diferentes períodos de armazenamento. **Acta Scientiarum. Animal Science**, v.29, n.4, p.371-377, 2007.

PITT, R. E.; MUCK, R. E.; PICKERING, N. B. A modelo of aerobic fungal growth in silage. 2. Aerobic Stability. **Grass and Forage Science**, v. 46, n. 3, p. 301-312, 1991.

REIS, R. A.; TEIXEIRA, I. A. M. A.; SIQUEIRA, G. R. Impacto da qualidade da forragem na produção animal. In: **Anais** de Simpósios da 43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. João Pessoa, Brasil. 2006.

RYSER, E. T.; ARIMI, S. M.; DONNELLY, C. W. Effects of pH on Distribution of Listeria Ribotypes in Corn, Hay, and Grass Silage. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 3695–3697. Vol. 63, No. 9, 1997.

REGO, T.C. Produtivismo, pesquisa e comunicação científica entre veneno e o remédio. **Educação e Pesquisa**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 325-346, abr./jun. 2014. In. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-97022014061843> acesso em 08 de fev. 2018.

RUIZ, R.L.; MUNARI, D.P. **Microbiologia da silagem**. In: Microbiologia zootécnica. São Paulo: Roca, p.97-122, 1992.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V. Current Probiotics - Safety Assured? Current Probiotics - Safety Assured?. **Journal Microbial Ecology in Health and Disease**. v.10, p. 68-77, 1998

SAGRILO, E. et al. Effect of harvest period on the quality of storage roots and protein content on the leaves in five cassava cultivars *Manihot esculenta* Crantz. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 2, p. 295-305, 2003.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2nd ed. Viçosa, MG: UFV, 2002.

SILVA, A.F.; SANTANA, L.M.; FRANÇA, C.R.R.S. et al. Produção de diferentes variedades de mandioca em sistema agroecológico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.1, p.33-38, 2009.

SILVA, M. D. A.; CARNEIRO, M. S. S.; PINTO, A. P.; POMPEU, R. C. F. F.; SILVA, D. S.; COUTINHO, M. J. F.; FONTENELE, R. M. **Avaliação da composição químico-bromatológica das silagens de forrageiras lenhosas do**

semiárido brasileiro. Seminário: Ciências Agrárias, Londrina, v. 36, n. 1, p. 571-578, 2015.

SIQUEIRA, G.R. **Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ensilada com aditivos químicos e microbianos**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2005. 92p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, 2005.

SOBRAL, A. J. S.; SANTANA, T. P.; SOUZA, E. Y. B.; MUNIZ, E. N.; RANGEL, J. H. de A.; CASTRO FILHO, E. S.; OLIVIERA, D. S. Composição bromatológica da silagem de dez cultivares de mandioca. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 4, 2014, Aracaju. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2014.

SOUZA, M. D. C. A.; HARDT, P. P. Evolução dos hábitos alimentares no Brasil. **Brasil Alimentos**, v. 15, p. 32-39, 2002.

SOUZA, L. D; SOUZA, L. da SILVA; GOMES, J. de C. Exigências edáficas da cultura da mandioca. In: **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Editor: Luciano da Silva Souza... [et al.]. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p.170-214.

TAYLOR, C.C.N., RANJIT, J., Mills, J.A., NEYLON, J.M. & KUNG JR., L. **The effect of treating whole plant barley with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation**, aerobic stability. 2002

TROMBINI, F. R. M.; LEONEL, M. Composição físico-química e propriedades tecnológicas da farinha de folhas de mandioca. **Energia Agrícola**, Botucatu, vol. 29, n.1, p.76-81, 2014.

TROPICOS. Tropicos. Available from, 2012. Disponível em: <http://www.tropicos.org> (acesso em 05 Março 2018).

VIEIRA, E. A.; FILHO, J. F.; ANDRADE, F. R. R.; **Mandioca no Cerrado – Questões Práticas**. Embrapa – Brasília, 2013.

VALLE, T.L.; CARVALHO, C.R.; RAMOS, M.T.B.; MÜHLEN, O.V.V. Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, v.63, p.221- 226, 2004.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052004000200007>

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.53-68, 1996.

WEYMARN, N.V. **Process of Development for Mannitol Production by Lactic Acid Bacteria**. PhD Dissertation, Helsinki University of Technology, Helsinki, Finland. 2002.

WILKS, D.; FARRINGTON, M.; RUBENSTEIN, D. 2003. The Infectious Diseases Manual. 2nd edition. **Blackwell Science Ltda.**

WISSELINK, H.W.; WEUSTHUIS, R.A.; EGGINK, G.; HUGENHOLTZ, J.; GORBEN, J.H. **Mannitol production by lactic acid bacteria: a review.** Int. Dairy J., 12 (2002), pp. 151-161

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

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

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. 36, supl. Especial, p. 170-189, 2009.

CAPÍTULO II

Lactobacillus buchneri EM SILAGEM DA FOLHA DE MANDIOCA

RESUMO

SANTOS, Micheline Thais, Universidade Federal de Alagoas, Março de 2018. *Lactobacillus buchneri* EM SILAGEM DA FOLHA DE MANDIOCA. Orientador (a): Tania Marta Carvalho dos Santos. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

Objetivou-se utilizar aditivo microbiano para verificar a qualidade da silagem de folha de mandioca. A forragem foi submetida aos tratamentos com adição e ausência do inoculante microbiano *Lactobacillus buchneri* cepa NCIMB 40788, dosagem recomendada pelo fabricante, observando-se dados correspondente a quatro repetições e em seis dias de abertura dos silos (0, 1, 7, 14, 28, e 56 dias). A adição do inoculante causou alterações ao longo do processo fermentativo. Foram observados decréscimos significativos para fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e extrato etéreo e acréscimos para matéria seca, proteína bruta, nitrogênio amoniacal, minerais, digestibilidade *in vitro* de matéria seca e carboidratos solúveis. Foram verificadas alterações nas populações de bactérias acidoláticas e enterobactérias. Não foram verificadas alterações nos valores de pH. A inoculação influenciou a produção dos ácidos graxos voláteis, mas ao final do processo a silagem sem inoculante apresentou menor concentração de ácido acético e maior de ácido lático, verificando-se para ácido cianídrico redução a partir do segundo dia de abertura dos silos. O aditivo microbiano não foi eficiente sobre a qualidade da silagem, porém encontra-se em nível nutricional limite a ser fornecida ao animal.

Palavras – chave: aditivo microbiano, bactérias acidoláticas, fermentação, ruminante.

ABSTRACT

SANTOS, Micheline Thais. Federal University of Alagoas, March 2018. *Lactobacillus buchneri* **IN SILAGE OF THE CASSAVA LEAF**. Advisor: Tania Marta Carvalho dos Santos. Dissertation (Master in Animal Science).

The objective was to use a microbial additive containing *Lactobacillus buchneri* to verify the quality of the cassava leaves silage. The forage was submitted to the tests with the addition and microbial inoculation *Lactobacillus buchneri* strain NCIMB 40788, made by the manufacturer, observing the first occurrences in six days of opening of the silo (0, 1, 7, 14, 28 and 56 days). Addition of the inoculant caused changes throughout the fermentation process. Significant decreases were observed for neutral detergent fiber, acid detergent fiber and ethereal extract, and additions to dry matter, crude protein, ammoniacal nitrogen, minerals, dry matter digestibility and soluble carbohydrates. Changes were observed in populations of lactic acid bacteria and enterobacteria. No changes were observed in the pH values. The inoculation influenced the production of the volatile fatty acids, but at the end of the process the silage without inoculant presented a lower concentration of acetic acid and higher of lactic acid, reducing to hydrocyanic acid from the second day of opening of the silos. The microbial additive was not efficient on the quality of the silage, but it is at the nutritional level limit to be supplied to the animal.

Keywords: microbial additive, acidolactic bacteria, fermentation, ruminant.

2.1.INTRODUÇÃO

A mandioca, também conhecida como aipim ou macaxeira, é uma cultura de grande produção na região nordeste devido à grande tolerância da planta aos solos de baixa fertilidade, à seca e a rusticidade. No campo, quando suas raízes são retiradas para consumo ou para a indústria, suas hastes são reutilizadas para a propagação do plantio, enquanto que as folhas são descartadas.

Tendo-se observado o desperdício das folhas da mandioca após a coleta das raízes, alguns técnicos e produtores têm usado o resto da cultura como alternativa de fonte de alimento para animais ruminantes, no período de escassez.

No entanto, a toxicidade encontrada nas folhas da mandioca devido ao alto teor de cianeto não permite que estas sejam fornecidas *in natura* ao animal, sendo recomendado adotar o método de ensilagem do material como conservação de alimento para animais, o qual poderá ser fornecido ao animal como única fonte de material ensilado ou associado com outro alimento disponível.

O uso de aditivos microbiológicos tem sido utilizado em silagens com o objetivo de inibir o crescimento de micro-organismos aeróbios (especialmente aqueles associados com a instabilidade aeróbia, ex. leveduras e *Listeria*), dos micro-organismos anaeróbios indesejáveis como enterobactérias e clostrídios, diminuir a atividade de proteases e deaminases da planta e dos micro-organismos, adicionar micro-organismos benéficos para dominar a fermentação, formar produtos finais de boa qualidade 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 o exposto, objetivou-se utilizar aditivo microbiano contendo *Lactobacillus buchneri* para verificar o ganho qualitativo da silagem de folha de mandioca.

2.2.MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos juntamente com as análises microbiológicas foram realizados no laboratório de Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias – UFAL, localizado em Rio Largo, Alagoas, sendo as análises bromatológicas e químicas (ácidos), realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual de São Paulo – Unesp, da cidade de Rio Claro, São Paulo. A colheita das folhas de mandioca foi realizada na zona rural da cidade de Teotônio Vilela (latitude 9° 29' 45" Sul, longitude 35° 49' 54" Oeste e altitude 165m), zona da

mata alagoana. A forragem utilizada foi obtida de plantação já estabelecida de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com a colheita realizada antes do florescimento, executada manualmente selecionando o terço final da parte aérea. Foram coletados 120 kg de matéria natural (MN). O material foi triturado em máquina forrageira, com partículas de tamanho médio de 3 cm. A forragem colhida foi submetida aos tratamentos com a adição e ausência de inoculante microbiano *Lactobacillus buchneri* cepa NCIMB 40788, na dosagem recomendada pelo fabricante (concentração de 5×10^4 bactérias/g de forragem),

Os silos foram confeccionados em garrafas PET (Politereftalato de etileno) com 30 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro. As folhas de mandioca foram compactadas manualmente. O aditivo foi aplicado às folhas na forma de solução aquosa, como fonte de bactérias heteroláticas *Lactobacillus buchneri*, com utilização de pulverizador manual, minutos antes das mesmas serem ensiladas.

A determinação da composição bromatológica da forragem ensilada foi realizada pelo método de Silva & Queiroz (2006), obtendo-se as seguintes variáveis para a forragem avaliada: proteína bruta (PB), matéria seca (MS), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIMS) e nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (N-NH₃), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e carboidratos solúveis (CHOs). Seguindo procedimentos técnicos descritos por Robertson & Van Soest (1981) para determinação de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA).

O perfil microbiológico analisado compreendeu recomendações descritas no Manual de Microbiologia de Alimentos (SIQUEIRA, 1995). Uma diluição prévia do material ensilado foi realizada retirando 25 g do conteúdo central de cada silo em 225 mL de solução salina estéril a 1%. O material foi submetido ao agitador de tubos numa frequência de 150 rpm por um período de 40 minutos. Após agitação, foram retirados 10 mL do extrato para as diluições posteriores. A partir dos extratos diluídos (10^{-1} a 10^{-6}) foram realizadas semeaduras em placas de Petri com meios específicos para cada micro-organismo e em seguida submetidas a incubação em temperatura e tempo ótimos de crescimento (Tabela 01). Os micro-organismos foram quantificados em Log UFCg¹ (Unidades Formadoras de Colônias) de acordo com suas características morfológicas.

Os valores de pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácidos (lático, butírico, acético, propiônico e cianídrico) e recuperação de matéria seca foram determinados nas silagens aos 56 dias. Após o término do processo, a silagem foi homogeneizada e uma parte pré-secada em estufa a 55 °C até peso constante, conforme recomendações de Silva & Queiroz, (2006).

Tabela 1: Meios de cultura utilizados para pesquisa de micro-organismos na silagem da folha de mandioca contendo *Lactobacillus buchneri*.

Micro-organismos	Meios de cultura	Temperatura/ Tempo
BAL¹	Caldo HDD (Homofermentative Heterofermentative Differential) + Ágar bacteriológico	37 °C/ 48h
Enterobactérias	Ágar Violet Red Bile	30 °C/ 24h
<i>Clostridium</i>	Meio de Carne Cozida	35 °C/ 72h
<i>Listeria</i>	BD PALCAM <i>Listeria</i> Ágar	30 °C/ 72h
Leveduras	YEPG (Yeast Extract Peptone Dextrose)	28 °C/ 7 dias
Fungos	Batata Dextrose Ágar + 10% de Ácido	30 °C/ 7 dias
Filamentosos	Tartárico	

¹BAL= bactérias acidoláticas

Os valores de pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácidos (lático, butírico, acético, propiônico e cianídrico) e recuperação de matéria seca foram determinados nas silagens aos 56 dias. Após o término do processo, a silagem foi homogeneizada e uma parte pré-secada em estufa a 55 °C até peso constante, conforme recomendações de Silva & Queiroz, (2006). A outra parte da silagem foi utilizada para extração do suco, com auxílio de uma prensa hidráulica para determinação dos valores de pH utilizando-se Phmetro de Bancada Digital Rbr e, o conteúdo de N-NH₃ por destilação com óxido de magnésio e cloreto de cálcio, empregando solução receptora de ácido bórico e titulação com ácido clorídrico a 0,1 N. Deste suco 10 mL foram acondicionados em recipientes contendo 2 mL da solução com ácido metafosfórico e congelados para avaliação posterior de teores dos ácidos (lático, acético, propiônico, butírico e cianídrico) por cromatografia gasosa.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial com quatro repetições, estabelecendo dois tratamentos para ensilagem da folha de mandioca, totalizando 48 unidades experimentais. Os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com uso do programa Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (Sisvar 5.6), usando regressão quando os tratamentos eram de natureza quantitativa, no caso dos tempos de abertura

dos silos. Em decorrência do tipo de comportamento, para os tempos de abertura, utilizaram-se modelos mais complexos, até grau quatro, visto que, em alguns casos, o modelo linear não foi hábil em representar as modificações temporais ocorridas ao longo do processo de fermentação. O modelo linear estatístico utilizado foi o seguinte: $Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + e_{ijk}$, em que: Y_{ijk} é o valor observado na k -ésima repetição do j -ésimo tempo e do i -ésimo inoculante; μ é uma constante inerente a todas as observações; a_i é o efeito do i -ésimo inoculante ($i = 1,2$); b_j é o efeito do j -ésimo tempo de abertura ($j = 1,2,3,4,5,6$); ab_{ij} é o efeito da interação entre o i -ésimo inoculante com o j -ésimo tempo de abertura.

2.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento da silagem com *L. buchneri* mostrou maiores efeitos sobre algumas das variáveis que compõem bromatologia da mesma, aos 56 dias de armazenamento, estando esses valores descritos na Tabela 2, os gráficos com as regressões encontram-se expressos em apêndice para melhor visualização dos resultados.

A MS obteve um efeito significativo de 21,40% para 28,80%, contando do tempo zero até a abertura do silo. Esse aumento pode ser resultado de uma menor produção de efluentes. O valor médio encontrado neste experimento foi maior que o relatado por Modesto et al. (2004) e aproximado por Schimidt et al. (2011) em silagem de cana-de-açúcar, inoculada com o mesmo micro-organismo, os quais obtiveram valores médios de 25,20% e 29,3% de MS, respectivamente.

Os teores de FDN e FDA em função dos dias de abertura dos silos apresentaram queda, com um maior declínio sendo observado na silagem inoculada. Para FDN, o tratamento da ensilagem resultou em decréscimo a partir do dia 1 de ensilagem, sendo observado uma redução total de 5,59% e 4,80% para as silagens com e sem inoculante, respectivamente. Com relação a FDA, verificou-se decréscimos significativos durante todo o processo, resultando, para ambos os tratamentos, ao fim dos 56 dias de experimento, perdas de 11,22 e 7,58%, respectivamente.

Os valores médios de FDN e FDA ao longo dos dias de abertura dos silos apresentaram um declínio em ambas as silagens estudadas. O FDN apresentou uma redução total de 5,59% para a silagem com o aditivo microbiano desde o dia um até aos 56 dias, obtendo-se uma média de 53,07% ao final do processo, no entanto esse valor foi superior ao encontrado por Fernandes et al., (2008), que estudando a parte aérea de diferentes variedades de mandioca observaram

uma média de 44,64% de FDN na matéria seca. O FDA de ambas silagens entrou em declínio a medida em que ocorria o processo de ensilagem, estando em menor quantidade na silagem com o inoculante *L. buchneri*. O valor médio obtido para o FDA na silagem inoculada foi de 36,46% aos 56 dias, causando uma diminuição total de 4,72% a contar do tempo zero.

Ao final do processo da ensilagem foi observado efeito significativo sob o teor de CHOs presente na silagem contendo o aditivo microbiano. A média obtida foi de 6,51%, bem maior que o valor encontrado por Azevedo et al., (2006) que foi de 1,48% em silagem das partes aéreas de cultivares de mandioca. Esse aumento de CHOs pode ser explicado, talvez por falta de um maior processo fermentativo, onde não houve grande aumento da população de bactérias acidoláticas, conseqüentemente menor quantidade de açúcar utilizado no metabolismo dessas bactérias e de alguns micro-organismos indesejáveis.

O teor de EE contido em ambas silagens sofreram alterações do tempo zero até o final do processo, mostrando uma média de 2,10% e 2,21% para as silagens com e sem inoculante bacteriano, respectivamente. Os resultados mencionados por Carvalho et al., (1983) foi de 2,96%, porém para Azevedo et al., (2006) o valor médio encontrado em silagem da parte aérea de cultivares de mandioca foi de 2,08%. Essa relação de baixos teores de EE pode estar ligado com uma provável participação das folhas de mandiocas com suas hastes no material ensilado, com isso diminuindo os níveis de óleos da silagem.

Ao quantificar a PB das silagens, percebeu-se que houve incremento em ambos materiais ensilados, no entanto o efeito significativo foi superior para a silagem contendo o *L. buchneri*, resultando em 16,5% de PB aos 56 dias. Gómez e Valdivieso (1985) observaram que o conteúdo proteico presente nas folhas da mandioca podem variar entre 17 e 34%, já para Guedes et al., (2007) encontraram variações neste teor em diferentes variedades, obtendo-se índice médio de 19,18%. As médias mencionadas por ambos pesquisadores são superiores ao valor encontrado no presente trabalho. Essa diferença pode estar relacionada a qualidade das folhas ao serem ensiladas, que sofrem alterações em sua composição bromatológica devido aos fatores edafoclimáticos ainda no processo de plantio. Enquanto que o incremento obtido de PB na silagem estudada pode ter sido resultado da baixa atividade proteolítica de bactérias indesejáveis, com isto ocasionando aumento da MS e redução de N-NH₃ da silagem.

Os teores de N-NH₃ encontrado em ambas silagens passaram por processo aumento gradativo ao longo dos dias, estando para efeito significativo a silagem com inoculante, a qual apresentou maior quantidade em relação a silagem não inoculada. A quantidade de N-NH₃ está relacionada a proteólise por micro-organismos presentes no material e que quanto menor o teor

identificado melhor será o produto final, no entanto observou-se para a silagem inoculada um valor de 1,28%, superior ao valor encontrado na silagem sem inoculante que foi de 1,017%. Entretanto, ambos valores encontram-se dentro do padrão mencionado por Van Soest (1994) em que para uma silagem de boa qualidade não poderá ultrapassar valores acima de 10%, pois este indica que o processo fermentativo resultou numa quebra excessiva de proteína em amônia. Os valores de nitrogênio amoniacal encontrados no presente trabalho foram semelhantes aos encontrados em silagens de mandioca de outros trabalhos. Portanto, esses valores ainda se mantêm baixo de acordo com os resultados encontrados por Azevedo et al. (2006) em silagem da parte aérea de cultivares de mandioca que variou entre 1,16 a 1,66%.

Com relação a MM do material, o efeito significativo também se deu para a silagem que recebeu o *L. buchneri* como inoculante, encontrando-se um valor médio de 7,49% e para a silagem sem o inoculante de 6,965%. Não é interessante para uma boa silagem altos valores de MM, pois esses minerais fazem parte da fração inorgânica do material, podendo causar diminuição de energia na silagem. Porém os valores encontrados em ambas silagens encontram-se dentro das variações mencionadas por Guedes et al (2007) que ao avaliarem diferentes variedades de mandioca encontraram resultados entre 5,78% a 7,96% de MM.

A DIVMS, assim como as outras variáveis já mencionadas, mostrou efeito significativo aos 56 dias do processo fermentativo, a qual obteve maior efeito para a silagem contendo o inoculante resultando em 51,347%, esse valor encontra-se abaixo do valor médio relatado por Alencar et al. (1988) que ao estudarem diferentes épocas e sistemas de corte da rama de mandioca encontraram valor de 60,37%, assim como Silva et al. (2001) também registraram valores de 63,84% superiores ao encontrado no presente trabalho. De acordo com Faustino et al. (2003) essa variação pode ser decorrente da diferença entre época de colheita, idade e cultivares da rama de mandioca, como também do alimento fornecido ao animal doador de líquido de rúmen.

Tabela 2: Valores médios da análise bromatológica da ensilagem de folha de mandioca dos tratamentos com e sem aditivo microbiano contendo *Lactobacillus buchneri*.

Parâmetros	Tratamento (Inoculação)	Tempo (dias)						Equação de regressão	r ²
		0	1	7	14	28	56		
Matéria seca (%)	COM	21,405 a	22,150 a	23,840 a	26,440 a	27,660 a	28,802 a	$y = -0,0038x^2 + 0,3371x + 21,727$	0,979
	SEM	21,405a	21,435 b	22,140 b	22,807 b	23,960 b	25,120 b	$y = -0,0009x^2 + 0,1173x + 21,36$	0,999
FDN (% MS)	COM	56,215a	55,735 b	55,287 b	55,257 b	53,977 b	53,075b	$y = 0,0005x^2 - 0,0835x + 56,02$	0,968
	SEM	56,235 a	56,235 a	56,560 a	56,165 a	55,910 a	55,535 a	$y = -0,0001x^2 - 0,0083x + 56,332$	0,813
FDA (% MS)	COM	41,187a	40,310a	40,622a	39,600a	38,425a	36,467b	$y = 0,0002x^2 - 0,0928x + 40,912$	0,969
	SEM	40,667a	40,432a	40,432a	40,055a	38,982a	37,585a	$y = -5E-05x^2 - 0,0527x + 40,656$	0,986
Proteína Bruta (% MS)	COM	13,420a	14,082a	14,397a	14,962a	15,460 a	16,592a	$y = -0,0006x^2 + 0,0834x + 13,759$	0,963
	SEM	13,462a	13,782b	13,992b	14,325b	14,660 b	15,455b	$y = -0,0003x^2 + 0,0479x + 13,626$	0,978
N-NH ₃ (%N total)	COM	0,422a	0,452 a	0,682a	0,952a	1,050a	1,277a	$y = -0,0003x^2 + 0,0342x + 0,4441$	0,971
	SEM	0,277 b	0,260b	0,365 b	0,517b	0,855b	1,017 b	$y = -0,0002x^2 + 0,0266x + 0,2329$	0,983
Extrato Etéreo (% MS)	COM	2,307b	2,437b	2,542b	2,502b	2,212b	2,107b	$y = 3E-05x^3 - 0,0025x^2 + 0,0413x + 2,352$	0,967
	SEM	2,467a	2,767a	2,957a	2,722a	2,355a	2,210a	$y = 5E-05x^3 - 0,0039x^2 + 0,0615x + 2,5981$	0,867
Minerais (%MS)	COM	5,320a	5,817a	6,197a	6,380a	7,065a	7,492a	$y = -0,0007x^2 + 0,0701x + 5,2678$	0,968
	SEM	5,132a	5,372b	5,942b	6,002b	6,655b	6,965b	$y = -0,0007x^2 + 0,0743x + 5,561$	0,962
DIVMS	COM	45,547a	45,667a	46,267a	46,917a	48,547a	51,347a	$y = -4E-05x^2 + 0,1061x + 45,533$	0,999
	SEM	45,497a	45,665a	46,665a	47,347a	48,280a	50,057b	$y = -0,0008x^2 + 0,1253x + 45,617$	0,991
CHOs (%MS)	COM	13,022a	12,732a	10,932a	8,432a	6,817a	6,510a	$y = 0,003x^2 - 0,3105x + 12,675$	0,997
	SEM	12,712a	12,427a	10,680a	8,607a	6,532a	4,610b	$y = 0,0042x^2 - 0,3487x + 13,005$	0,990

Comparação de médias entre tratamentos. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (P <0,05). ns= não significativo.

Os valores médios das populações de micro-organismos analisadas nas silagens da folha de mandioca encontram-se expressos na Tabela 03, os gráficos com as regressões encontram-se expressos em apêndice para melhor visualização dos resultados as quais sofreram alterações com a utilização do *Lactobacillus buchneri* como inoculante, causando principalmente inibição do crescimento de micro-organismos indesejáveis, como as bactérias do gênero *Clostridium* e *Listeria*.

Para a população de BAL, as respostas se ajustaram em efeito quadrático em ambas silagens. Esperava-se que as populações dessas bactérias se elevassem após a aplicação do *L. buchneri* na silagem da folha de mandioca, no entanto houve uma redução de crescimento no tempo zero até os 56 dias de fermentação. De acordo com MUCK (1996), um dos fatores determinantes para o sucesso da aplicação de inoculantes microbianos em silagens é a compatibilidade entre a planta e os micro-organismos utilizados, visto que a silagem das folhas de mandioca possuem baixo teor de carboidratos para utilização do metabolismo dessas bactérias, diferentemente da silagem de cana-de-açúcar, onde os valores de carboidratos presente são elevados colaborando para o processo fermentativo para o metabolismo das bactérias acidoláticas.

As bactérias acidoláticas cresceram durante 1 a 4 semanas, baixando o pH da ensilagem e inibindo o crescimento de outros micro-organismos. Quando o pH decresce, ou o substrato acaba, essas bactérias ficam inativas e sua população diminui. Isto foi observado em ambos os tratamentos (com e sem inoculante), onde verificou-se que a população de BAL total permaneceu estável do 1 aos 14 dias de ensilagem. Aos 28 dias houve um declínio apenas para o material inoculado, retomando o crescimento de algumas células aos 56 dias.

Com relação a população de bactérias hetero e homofermentativas, as equações que se ajustaram às modificações dessas variáveis foram polinômios de terceiro e quarto grau. As heterofermentativas sofreram decréscimo significativo apenas aos 56 dias, para o tratamento com inoculante enquanto que para a silagem sem inoculação o declínio ocorreu a partir dos 28 dias até o final do processo. Para a silagem sem inoculante a população não sofreu alteração.

O crescimento das enterobactérias ajustou-se de forma linear decrescente ao tempo de ensilagem (0,0006 e 0,0391 inoculada e não inoculada, respectivamente). Não havendo diferença para nenhum dos dias de abertura do silo. A população de enterobactérias atingiu valor máximo do primeiro aos 28 dias de fermentação em ambos materiais ensilados. Para a

silagem não inoculada, a população esteve abaixo do valor mínimo detectável ($<2,0 \text{ Log UFCg}^{-1}$) aos 56 dias de abertura dos silos.

As enterobactérias normalmente crescem extensivamente durante os primeiros dias de ensilagem, mas sua população decresce rapidamente à medida que o meio é acidificado. No entanto, durante a deterioração aeróbia das silagens, a qual é associada com degradação de ácido lático e acético, as enterobactérias têm oportunidade adicional para reiniciar o crescimento (OSTLING & LINDGREN, 1995).

Ostling e Lindgren (1995) afirmaram que a presença de enterobactérias, pode tornar a silagem mais estável na fase aeróbia através da produção de alguns compostos durante a fermentação, ocasionando a inibição de leveduras durante a exposição aeróbia. Somado a esse fato as enterobactérias podem produzir nitrito e óxido nítrico que são compostos inibidores de *Clostridium* (ARCURI et al., 2003).

Para a população de leveduras também foi observado interação entre tratamentos e tempo de abertura dos silos, em geral, a presença do *Lactobacillus buchneri* reduziu a população de leveduras, sendo esse efeito observado mais intenso aos 1, 14, e 28 dias de ensilagem, sendo os maiores decréscimos observados para o tratamento com inoculante, as médias foram significativas indicando dependência entre os dois fatores. Para os fungos filamentosos, o inoculante proporcionou estabilidade de crescimento em ambas silagens, para todos os períodos de tempo.

A ausência de micro-organismos indesejáveis na ensilagem, como *Clostridium* e *Listeria*, estão relacionados com o baixo valor de pH, porque segundo McDonald et al. (1991), o pH é um dos fatores principais para o controle desses micro-organismos durante a fermentação da silagem.

As médias de pH obtidas da silagem com e sem aditivo microbiano, mostrou-se satisfatórios de acordo com os resultados encontrados por Borges et al. (1997) que citam valores entre 3,5 e 4,2 como adequados, já para Faustino et al. (2003) em sua pesquisa testando silagem do terço superior da parte aérea apresentaram valores um pouco elevado, acima de 4,2 e outros que variaram até pH 5, o que provavelmente ocorre devido a uma maior quantidade de proteínas nesse tipo de material (MOISIO & HEIKONEM, 1994).

Tabela 3: Valores médios em Log UFCg1 dos micro-organismos significativamente presentes na silagem de folha de mandioca e equação de regressão para os tratamentos com e sem aditivo microbiano.

Micro-organismos	Tratamento (Inoculação)	Tempo (dias)						Equação de regressão	r ²
		0	1	7	14	28	56		
Bactérias	COM	8,067a	8,114a	8,139 ^a	7,995a	6,991b	6,613a	$y = 0,0002x^2 - 0,0382x + 8,2217$	0,902
Acidoláticas Totais	SEM	8,067a	8,114a	8,139 ^a	7,049a	7,055a	6,108b	$y = 0,0003x^2 - 0,0536x + 8,1526$	0,904
Homofermentativas	COM	7,580a	7,635a	7,675 ^a	7,482a	7,337b	7,226b	$y = 1E-05x^3 - 0,0009x^2 + 0,0047x + 7,6154$	0,938
	SEM	7,525a	7,550a	7,642 ^a	7,553a	7,593a	7,641a	$y = -2E-06x^4 + 0,0002x^3 - 0,0056x^2 + 0,0472x + 7,5178$	0,987
Heterofermentativas	COM	8,145a	7,932a	7,953 ^a	7,833a	7,882a	7,133b	$y = -2E-05x^3 + 0,0016x^2 - 0,0328x + 8,0679$	0,968
	SEM	7,915a	7,973a	7,970 ^a	7,873a	7,967a	7,953a	$y = 2E-06x^4 + 0,0002x^3 - 0,005x^2 + 0,0331x + 7,9278$	0,937
Enterobactérias	COM	2,355a	2,321a	2,354 ^a	2,336a	2,351a	2,306a	$y = -0,0006x + 2,3422$	0,759
	SEM	2,311a	2,366a	2,331 ^a	2,365a	2,331a	0,000b	$y = -0,0391x + 2,6492$	0,763
Leveduras	COM	6,997a	6,797b	6,904 ^a	6,542b	5,912b	5,336a	$y = -0,03x + 6,9454$	0,959
	SEM	6,978a	6,964a	6,994 ^a	6,692a	6,316a	5,369a	$y = 0,0294x + 7,0714$	0,980
Fungos Filamentosos	COM	6,543a	6,473a	6,377 ^a	5,892a	5,306a	5,311a	ns	
	SEM	6,494a	6,429a	6,383 ^a	5,971a	5,434a	5,365a		
Médias de pH ¹	COM	3,90 a	3,927 a	3,950 a	4,000 a	3,950 a	3,975 a	ns	
	SEM	3,875 a	3,900 a	3,925 a	4,050 a	4,025 a	4,075 a		

Comparação de médias entre tratamentos. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (P <0,05). ns= não significativo.

Pode-se observar que para ambas as silagens os valores adequaram-se ao modelo linear de regressão em função dos dias de abertura dos silos, independente da presença do inoculante. Esse resultado pode indicar uma otimização de vários fatores envolvidos no processo de ensilagem, não havendo inibição por anerobiose ou acidez, visto que elas sobrevivem numa faixa muito ampla de pH e também em anaerobiose. Segundo McDonald et al. (1991) para a maioria das espécies existentes nas silagens o pH ótimo encontra-se entre 3,5 e 6,5, sendo que algumas espécies são capazes de sobreviver em pH igual ou inferior a 2,0.

Esse resultado provavelmente se deve ao pH da silagem, visto que, as mesmas são inibidas com valores abaixo de 4,5, porém podem voltar a atuar no pós-abertura através do consumo de ácido lático e acético se as condições de anaerobiose não forem alcançadas adequadamente. Esses micro-organismos apresentam grande capacidade de sobrevivência e podem ser encontrados até os 30 dias de conservação, por terem habilidade de crescimento sob condições de anaerobiose protegendo-se ao encontrarem sob condições adversas, tal qual acontece sob valor de pH muito baixo.

Conforme verificou-se para a produção de ácidos, exposto na Tabela 4, o processo de ensilagem com o uso de *Lactobacillus buchneri* causou uma maior redução de produção de ácido cianídrico para a silagem com inoculação, apresentando ao final do processo médias de 54,02 e 50,12% (inoculada e não inoculada respectivamente) em relação a forrageira. Esse efeito está de acordo com SOARES (2003), que ao trabalhar com silagem de folhas e ramos de mandioca encontrou redução de 78% no teor de ácido cianídrico, indicando que a ensilagem é uma opção para a redução do conteúdo cianogênico, Além disso, a silagem de folhas da mandioca apresenta boa palatabilidade quando utilizadas como fonte alimentar para ruminantes (MARJUKI et al., 2008).

A interação ocorrida entre os tratamentos e o tempo de abertura dos silos mostrou-se eficiente para os teores dos ácidos acético e lático, porém o mesmo não ocorreu para o ácido propiônico. Aos sete dias de fermentação a produção de ácido acético foi significativamente mais alta na silagem sem inoculante, dos 14 aos 28 dias, apresentando diminuição de produção no último dia do processo para a silagem inoculada.

A produção de ácido lático não se mostrou sobre efeito do inoculante do 0 e 7 dias de abertura do silo em ambas silagens, para os demais períodos observou-se maior produção de ácido para a silagem não inoculada. Esse efeito observado para o ácido lático, resulta do aumento proporcional de ácido acético sintetizado pelo *L. buchneri* inoculado, que são bactérias

heterofermentativas inoculadas, ou pela degradação do ácido lático a acético por estes micro-organismos.

Segundo Oude Elferink et al. (2000), as bactérias da espécie *L. buchneri* têm habilidade de metabolizar o ácido lático a acético e 1,2- propanodiol que, posteriormente, pode ser degradado a ácido propiônico e 1-propanol por outros micro-organismos presentes na silagem, como a bactéria *L. diolivorans*. Por ser mais tolerante às condições ácidas, a bactéria *L. buchneri* pode permanecer ativa durante a fase final de fermentação e, nesse caso, pode ser responsável pelo segundo pico de produção de ácido acético, como de ácido lático, nas silagens (MCDONALD et al., 1991).

Foi observado aumento linear do ácido butírico em relação aos tempos de abertura dos silos. Apesar do aumento verificado, este foi de 6×10^{-5} por dia de fermentação para ambas as silagens. Em trabalho realizado por Schimdt et al. (2011) também não encontraram valores significativos para os ácidos (acético, lático, propiônico e butírico) em silagem de cana-de-açúcar contendo aditivo microbiano com *L. buchneri*, mostrando que a inoculação com esse micro-organismo não obteve resultado efetivo em aumentar a produção de ácidos da silagem. Segundo McDonald et al. (1991), o metabolismo das bactérias homoláticas é acelerado em relação às heteroláticas, prevalecendo assim, a fermentação lática sobre os micro-organismos heterofermentativos.

Ao contrário dos relatos na literatura, a silagem inoculada apresentou menores teores de ácido acético do que naquela não inoculada. Uma das principais funções do *L. buchneri* ao ser adicionado à silagem é o aumento da produção de ácido acético, reduzindo a população de leveduras e, conseqüentemente, a produção de etanol e as perdas de MS nas silagens. No entanto, o que se observa é que em silagens de outras forrageiras há uma grande variação nos resultados. Em algumas pesquisas há um aumento na produção de ácido acético, redução no crescimento de leveduras e na produção de etanol, com conseqüente redução das perdas de MS. Contudo, em outras verificam-se aumento na produção de ácido acético sem haver redução no crescimento de leveduras e na produção de etanol.

É possível que a origem do ácido acético sejam as enterobactérias, que também fermentam açúcares e produzem ácido lático, acético e etanol como as BAL, mas o principal produto é o ácido acético (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Tabela 4: Valores médios de ácidos da ensilagem de folha de mandioca dos tratamentos com e sem aditivo microbiano contendo *Lactobacillus buchneri*.

Ácidos	Tratamento (Inoculação)	Tempo (dias)						Equação de regressão	r ²
		0	1	7	14	28	56		
Cianídrico	COM	0,036a	0,030b	0,026b	0,022b	0,017b	0,01b	$y = -0,0006x + 0,0307$	0,883
	SEM	0,036 a	0,032a	0,036a	0,028a	0,025a	0,014a	$y = -0,0004x + 0,0351$	0,930
Acético	COM	0,0167a	0,00562a	0,0045b	0,995a	0,982a	0,93a	$y = -0,0008x^2 + 0,0645x - 0,0701$	0,829
	SEM	0,05a	0,062a	0,0792a	1,00a	1,00a	1,20b	$y = -0,0007x^2 + 0,0587x - 0,009$	0,868
Lático	COM	0,775a	1,46 a	2,05a	2,64b	3,6b	3,755b	$y = 0,0524x + 1,37$	0,772
	SEM	0,787a	0,95b	2,157a	2,95a	4,077a	4,04a	$y = 0,0545x + 1,6161$	0,743
Butírico	COM	0,0012b	0,0014b	0,0014b	0,0017b	0,00257b	0,0045b	$y = 6E-05x + 0,0011$	0,978
	SEM	0,0016a	0,0018a	0,0018a	0,00217a	0,003a	0,005a	$y = 6E-05x + 0,0015$	0,980
Propiônico	COM	0,011a	0,012 a	0,015 a	0,048 a	0,036 a	0,036 a	ns	
	SEM	0,036a	0,015 a	0,018 a	0,018 a	0,027 a	0,040 a		

Comparação de médias entre tratamentos. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% ao nível de 5% de significância ($P < 0,05$).

A reduzida quantidade do ácido butírico detectado na silagem com o aditivo microbiano está relacionado ao fato de que a população de *Clostridium* esteve abaixo do valor mínimo detectável (<2,0 Log ufc/g) no presente trabalho

As bactérias do gênero *Clostridium* são as principais responsáveis pela produção de ácido butírico, sendo a presença do mesmo indicativo da produção da concentração deste. Essas bactérias são capazes de degradar proteínas e ácido láctico para produzir ácido butírico, reduzindo a aceitabilidade pelos animais, além de serem patogênicas aos animais e aos manipuladores do material, o que torna a presença das mesmas indesejáveis.

O *Lactobacillus buchneri* é um micro-organismo heterolático bastante utilizado em silagens de gramíneas, principalmente cana-de açúcar, onde a quantidade de carboidratos utilizados para seu metabolismo durante a fermentação é superior ao encontrado nas folhas da mandioca, a qual se utiliza de grande parte para armazenamento em forma de amido em suas raízes.

2.4.CONCLUSÕES

A silagem de folha de mandioca encontra-se sob condições de fornecimento ao consumo animal, apresentando níveis nutricionais em limites mínimos de qualidade.

O inoculante utilizado no processo de ensilagem teve efeito estabilizador e de inibição sobre micro-organismos indesejáveis.

O *Lactobacillus buchneri* não mostrou tanta eficiência sobre a fermentação da folha de mandioca no processo de ensilagem, sendo inviável o uso desse inoculante para esta cultura.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, L. A. B. et al. Rendimento forrageiro e de raízes de mandioca submetida a diferentes épocas e sistemas de corte da parte aérea. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA*, 5. 1988, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: SBZ, 1988. p. 50

ARCURI, P.B.; CARNEIRO, J.C.; LOPES, F.C.F. **Microrganismos indesejáveis em forragens conservadas: efeito sobre o metabolismo de ruminantes**. In: Reis, R.A.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R. et al. (Org.). *Volumosos na produção de ruminantes: valor alimentício de forragens*. 1ª ed. Jaboticabal: v., p. 51-69, 2003.

AZEVEDO, E.B.; NÖRNBERG, J.L.; KESSLER, J.D.; BRUNING, G.; DAVID, D.B.; FALKENBERG, J.R.; CHIELLE, Z. G. Silagem da parte aérea da mandioca. **Ciência Rural**, 2006; v.36, n.6, p.1902-1908. <http://www.revistas.bvs-vet.org.br/crural/article/view/18621>

BORGES, A.L.C.C. et al. Qualidade da silagem de híbridos de sorgo de porte alto, com diferentes teores de tanino e de umidade no colmo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 1997; v.49, n.44, p.441-452.

CARVALHO J.L.H.; PERIM, S.; COSTA, I. R. S. **Parte aérea da mandioca na alimentação animal. I. Valor nutritivo e qualidade da silagem**. Brasília: EMBRAPA – CPAC, 1983a. 6p. (Comunicado Técnico, 29).

FAUSTINO, J.O. et al. Efeito da ensilagem do terço superior da rama de mandioca triturada ou inteira e dos tempos de armazenamento. **Acta Scientiarum**, v.25, n.2, p.403-410, 2003.

FERNANDES, F.D.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; VIEIRA, E.A.; FIALHO, J.F.; FALEIRO, F.G. **Composição química das folhas e da parte aérea de acessos de mandioca de indústria aos seis meses de rebrotação**. In: IX Simpósio Nacional Cerrado – Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. 2008 Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/260318005> (Acesso em 09 de Mar de 2018).

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema SISVAR para análises estatísticas**. Lavras: UFV, p.66, 2000.

GUEDES, P.L.C.; LEMOS, P.F.B.A.; ALBUQUERQUE, R.P.F.; COSTA, R.F.; CHAGAS, N.G.; CUNHA, A.P.; CAVALCANTI, V.R. Produção de forragem de mandioca para alimentação de bovinos leiteiros no agreste paraibano. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.1, n.2, p.53-59, 2007.

GÓMEZ, G.; VALDIVIESO, M. Cassava foliage: chemical composition, cyanide content and effect of drying on cyanide elimination. **Journal of Science and Food Agriculture**. v.29, n.1, p.433-441, 1985.

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**. 1. ed. Madison: American Society of Agronomy, p.305 – 360, 2003.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Merlow: Chalcomb Publications, 340p. 1991.

MENDES, C. Q; SUSIN, I; NUSSIO, L. G; PIRES, A. V; RODRIGUES, G. H; URANO, F. S. Efeito do *Lactobacillus buchneri* na fermentação, estabilidade aeróbia e no valor nutritivo de silagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.12, p.2191-2198, 2008.

MODESTO, E. C.; SANTOOS, G. T.; VILLELA, D.; SILVA, FAUSTINO, J. O.; JOBIM, C. C.; DETMANN, E.; ZAMBOM, M. A.; MARQUES, J. A. Caracterização químico-bromatológica da silagem do terço superior da rama de mandioca. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v. 26, no. 1, p. 137-146, 2004.

MOISIO, T.; HEIKOMEN, M. Lactic acid fermentation in silage preserved with formic acid. **Journal Animal Feed Science and Technology**, v.47, n.1, p.107-124, 1994.

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.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; KROONEMAM, J.; GOTTSCHAL, J. A.; SPOELSTRA, S. F.; FABER, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 125-132, Jan. 2001.

ROBERTSON, J. B.; VAN SOEST, P. J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: **The analysis of dietary fiber in food**. New York: p.123-158, 1981.

SCHMIDT, P.; JUNIOR, P. R.; JUNGES, D.; DIAS, L. T.; ALMEIDA, R.; MARI, L. J. Novos aditivos microbianos na ensilagem da cana-de-açúcar: composição bromatológica, perdas fermentativas, componentes voláteis e estabilidade aeróbia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.3, p.543-549, 2011.

SILVA, D. C. *et al.* Avaliação do uso de fezes equina e bovina como fonte de inóculo para determinação da digestibilidade *in vitro* de diferentes alimentos. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: UEPG, p.326-327, 2001.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 3.ed, p.235, 2006.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTAA, p.159, 1995.

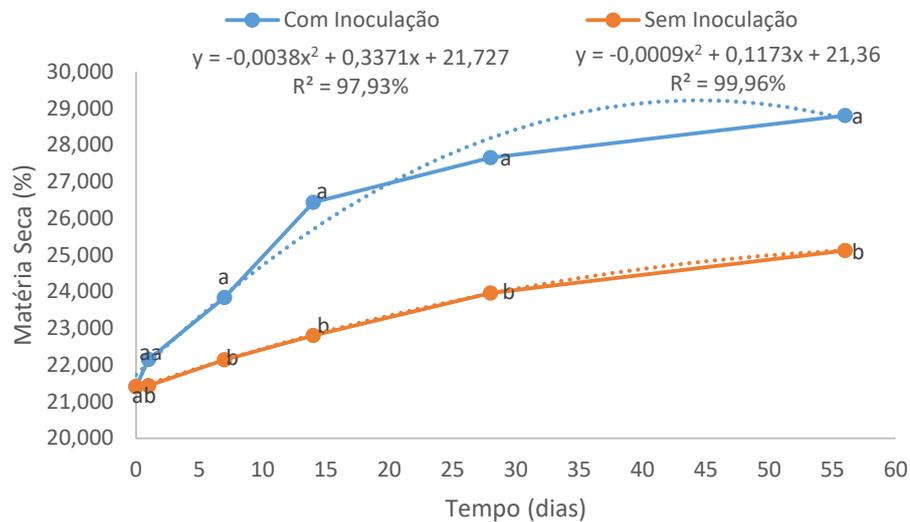
SOARES, J.G.G. **Silagem de maniçoba**: uma excepcional forragem. 2003. Disponível em: <http://www.cpsa.embrapa.br/artigos/manicoba.html>. Acesso em: 17/08/2018.

ÖSTLING, C. E. AND LINDGREN, S. E. Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. **Journal Appl Bacteriol**, 18-24. 1985.

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

APÊNDICE

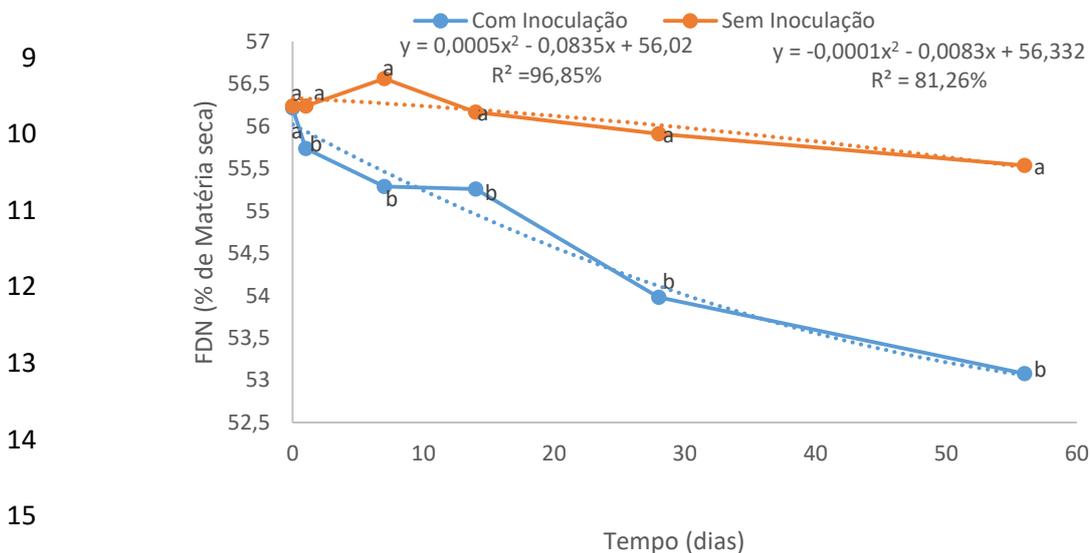
- 1 **Figura 1** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 2 dos teores de matéria seca das silagens da parte aérea da mandioca com e sem inoculação
 3 de *Lactobacillus buchneri* em função dos tempos de abertura dos silos.



4

- 5 **Figura 2** - Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 6 dos teores de FDN das silagens da parte aérea da mandioca com e sem inoculação de
 7 *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.

8

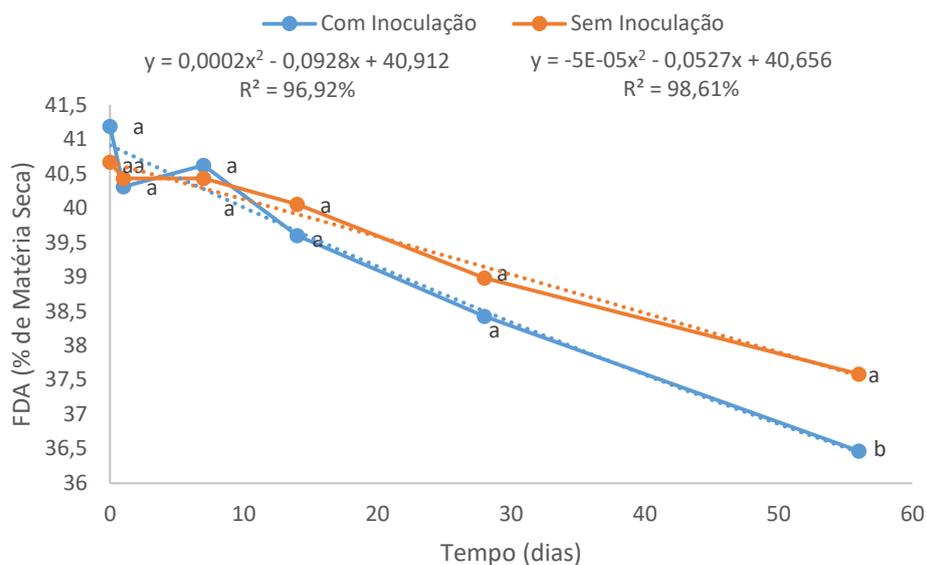


15

16

- 17 **Figura 3** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 18 dos teores de FDA das silagens da parte aérea da mandioca com e sem inoculação de
 19 *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.

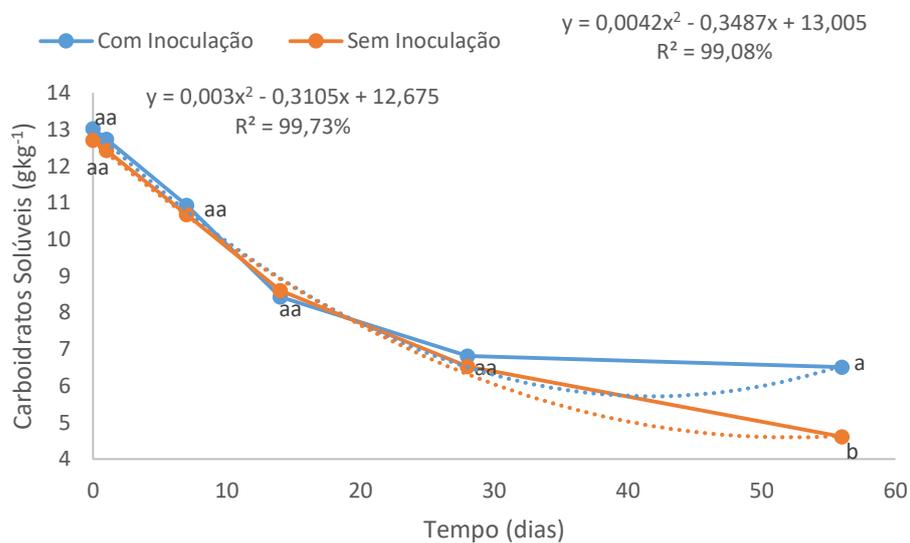
20



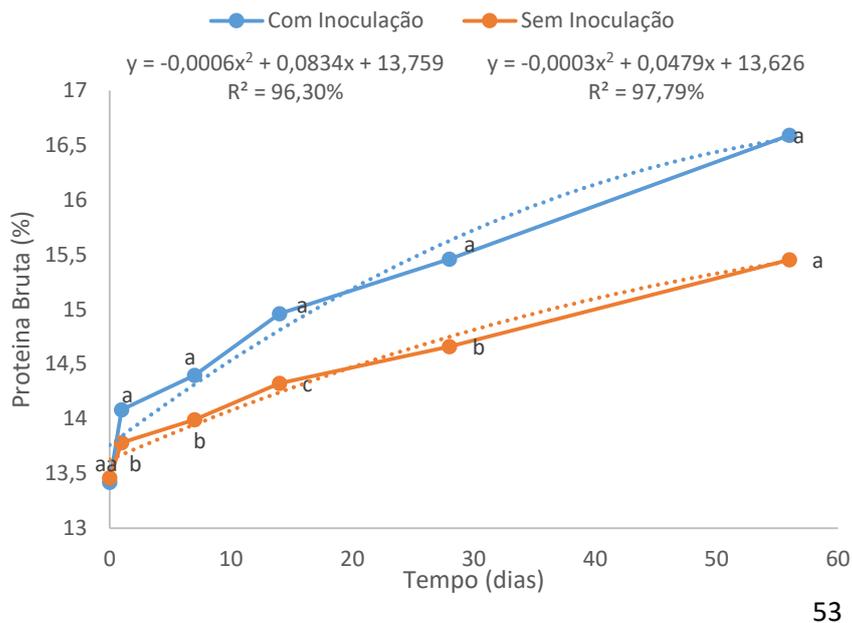
29

30 **Figura 4** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 31 dos teores de **CHO**s das silagens da parte aérea da mandioca com e sem inoculação de
 32 *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.

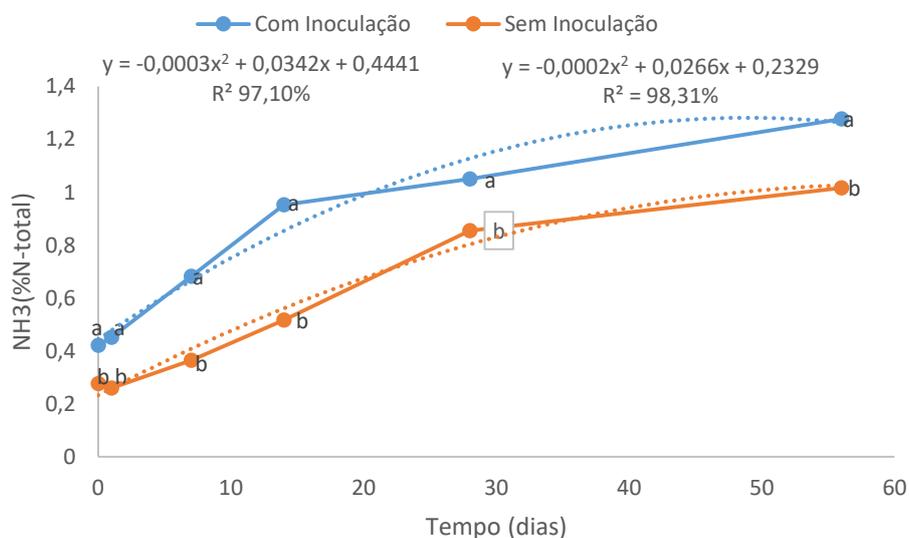
33



42 **Figura 5** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 43 dos teores de Proteína Bruta das silagens da parte aérea da mandioca, com e sem
 44 inoculação de *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.

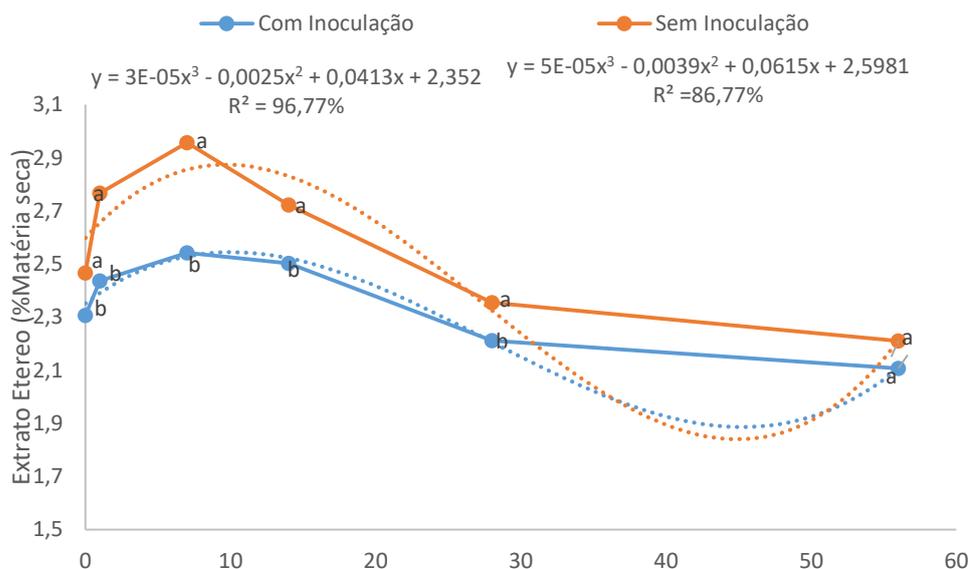


54 **Figura 6** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 55 dos teores de NH_3 das silagens da parte aérea da mandioca com e sem inoculação de
 56 *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.

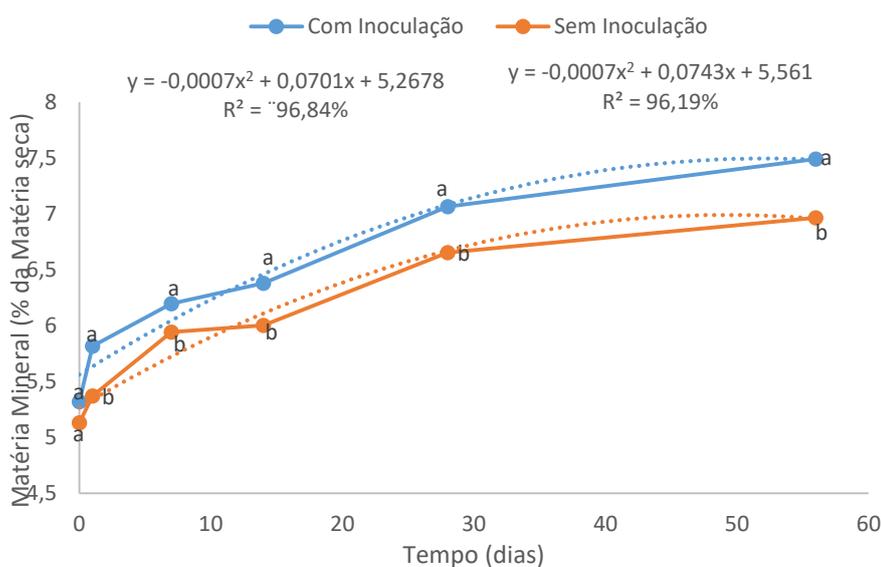


69 **Figura 7** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 70 dos teores de EE das silagens da parte aérea da mandioca com e sem inoculação de
 71 *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.

72



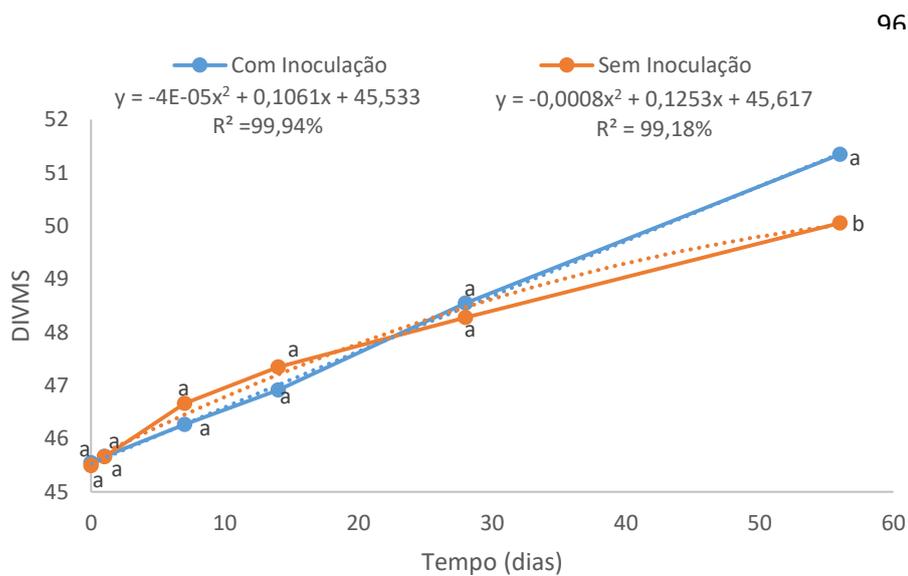
80 **Figura 8** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 81 dos teores de MM das silagens da parte aérea da mandioca com e sem inoculação de
 82 *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.



91

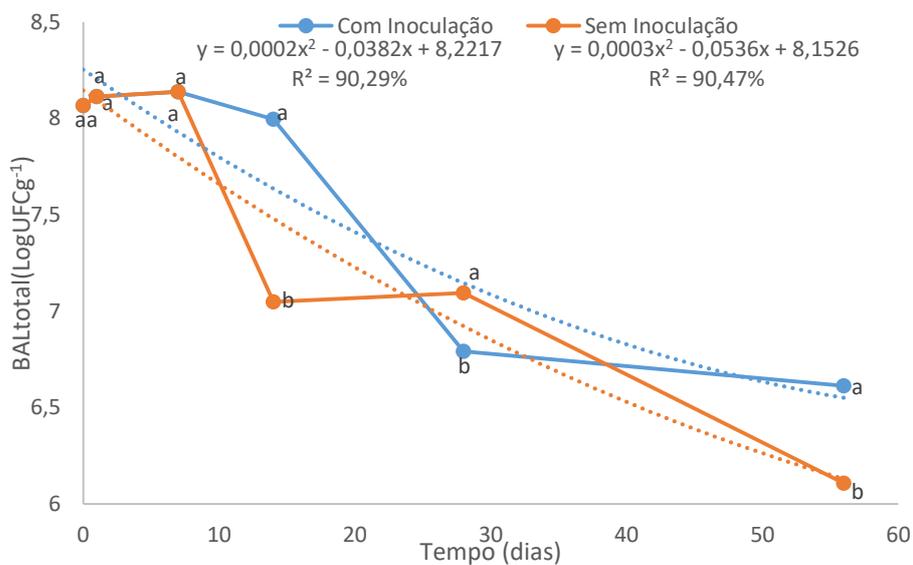
92

93 **Figura 9** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 94 dos teores de DIVMS das silagens da parte aérea da mandioca com e sem inoculação de
 95 *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.



104 **Figura 10** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 105 do crescimento de BAL total das silagens da parte aérea da mandioca com e sem
 106 inoculação de *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.

107



114

115

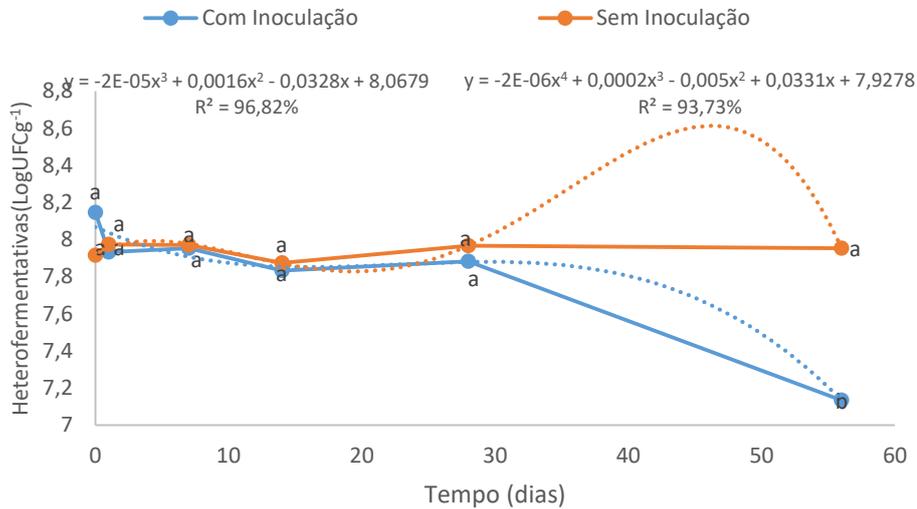
116

117

118 **Figura 11** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 119 do crescimento de heterofermentativa das silagens da parte aérea da mandioca com e sem
 120 inoculação de *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.

121

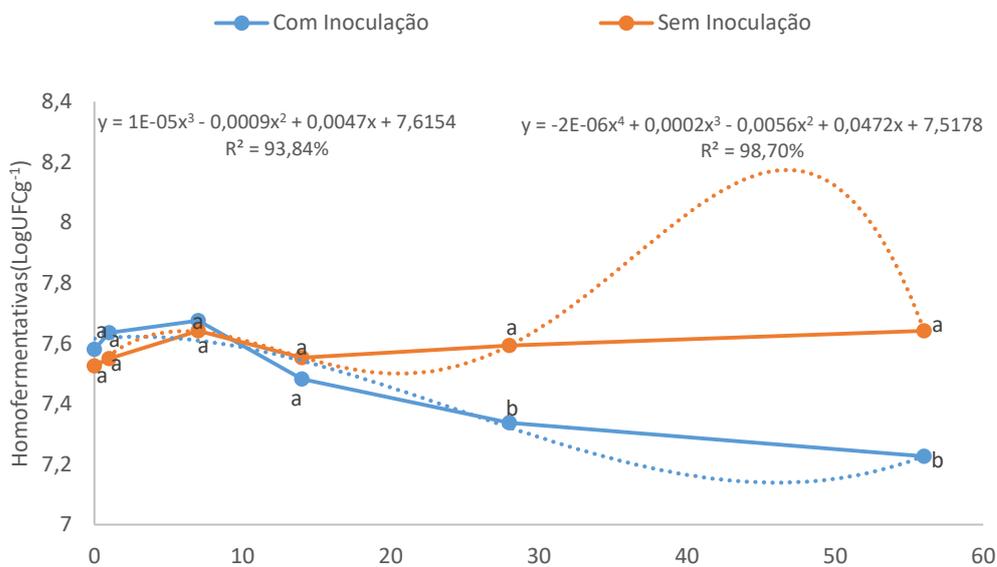
122



128

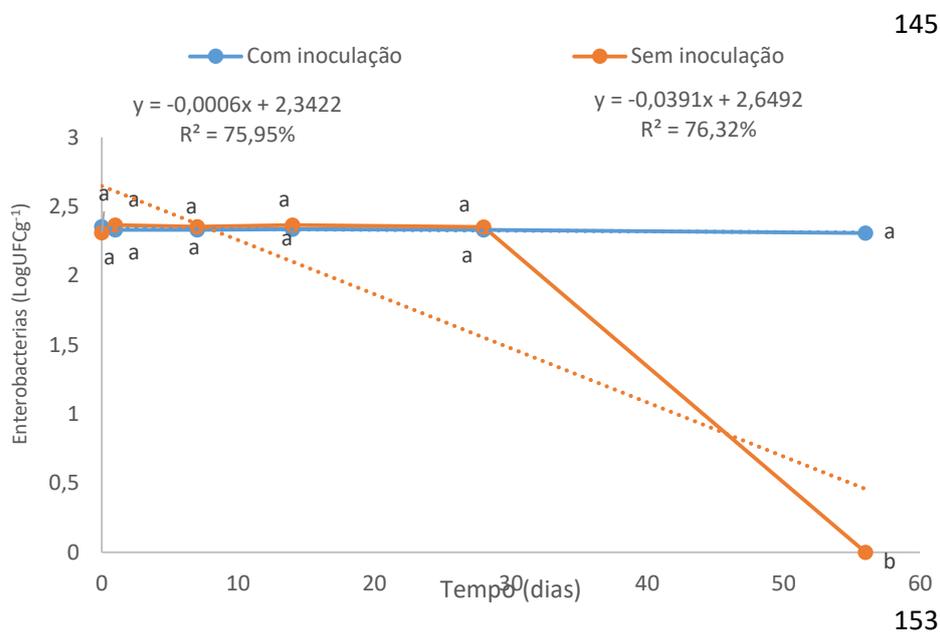
129

130 **Figura 12** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 131 do crescimento de homofermentativa das silagens da parte aérea da mandioca com e sem
 132 inoculação de *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.



141

142 **Figura 13** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 143 de crescimento de enterobactérias das silagens da parte aérea da mandioca com e sem
 144 inoculação de *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.



154 **Figura 14** – Representação gráfica, equações de regressão e coeficiente de determinação
 155 de crescimento de leveduras das silagens da parte aérea da mandioca com e sem
 156 inoculação de *Lactobacillus buchneri*, em função dos tempos de abertura dos silos.

